



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

REQUIMTE

Departamento de Química

Contribuição para o estudo da hidrólise enzimática acelerada da β -lactoglobulina por meio de ultra-sons

Jorge Emanuel Teixeira de Castro Martinho

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar área de especialização Segurança Alimentar

Orientador científico: Doutor José-Luis Capelo Martínez

Monte da Caparica

2008

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. José Capelo, pela iniciativa enérgica contagiante

Ao meu co-orientador, Hugo Santos, pela paciência em inserir-me numa área que me era desconhecida e por toda a informação que disponibilizou de forma rigorosa

À Prof. Isabel Moura, por disponibilizar algum do seu equipamento

À Sofia Pauleta e Gabi Almeida pelas dicas

A todos os que participaram na prova de degustação

Aos meus colegas de laboratório, em particular ao Ricardo pelo interesse e apoio que deve estar presente num colega e investigador

À minha irmã Ana Cristina pela preocupação

Aos meus “pais”, em particular à minha mãe, Felicidade, pelo tempo que dedicou

À minha Joaninha, pelo tempo que não passei com ela

À Ana por estar presente, sempre que me desviei do trilho e foram muitas as vezes em que pensei ficar a meio caminho

Resumo

O leite, um alimento com um peso importante na alimentação a nível mundial, a par de todos os benefícios obtidos com a sua ingestão, pode desencadear reacções de alergia. Das várias proteínas presentes no leite a β -Lactoglobulina (β -LG) foi a proteína seleccionada para estudar neste trabalho uma vez que apresenta um potencial efeito alergogénico.

De modo a reduzir a alergenicidade do leite, este poderá ser tratado de forma a não ter as proteínas intactas. Este tipo de tratamento é moroso e caro, a hipótese de serem substituídos por uma digestão enzimática acelerada por meio de ultra-sons é o principal objectivo deste estudo.

O trabalho experimental foi efectuado utilizando as seguintes amostras de leite em pó: leite de vaca magro “Molico” da Nestlé e leite de vaca “Aptamil Júnior” da Milupa.

Procederam-se a vários ensaios para degradação da β -LG comercial e das amostras de leite por hidrólise enzimática utilizando a tripsina, para verificar a eficácia desta, com e sem tratamento prévio e ainda com e sem aplicação de ultra-sons.

Testaram-se vários equipamentos de sonicação (Tweeter, UTR200, Sonda UP50H, Transsonic TI-H-5), de forma a avaliar a sua eficácia e aplicabilidade na aceleração da digestão da β -LG.

Para confirmar a ocorrência de hidrólise da β -LG presente nas amostras de leite utilizou-se nos primeiros ensaios a análise por MALDI-TOF-MS e posteriormente a análise do perfil proteico por electroforese SDS-PAGE.

O processamento do leite implica algumas modificações do valor nutricional, principalmente de proteínas e vitaminas, assim como alterações a nível sensorial. Estas alterações foram avaliadas recorrendo a uma prova de análise sensorial, confirmando-se alterações no aspecto e sabor.

No tratamento com o ultrasonicador Tweeter não foram identificados todos os péptidos que seriam esperados com uma hidrólise completa.

Em relação à digestão enzimática acelerada com o sonoreactor UTR200, a amostra da proteína β -LG com tratamento prévio de redução e alquilação apresenta tempos para hidrólise enzimática mais curtos sendo a hidrólise completa. Em relação à amostra de leite sem tratamento prévio os tempos para hidrólise enzimática são mais longos, sendo a hidrólise incopleta.

A digestão das amostras utilizando a sonda UP50H, nas condições testadas, não apresenta resultados significativamente diferentes dos obtidos com o sonoreactor UTR200.

Abstract

An important food like milk with one big role in feeding the world-wide, along with all the benefits with its ingestion, can unchain allergy reactions of some proteins of the milk like the β -Lactoglobulin (b-LG), the protein selected for this study.

Milk has to be treated in a way that it hasn't intact proteins, thus reducing its allergenicity. Such treatment is time consuming and expensive, the hypothesis to substitute such treatments for a speed up enzymatic digestion by means of ultrasounds is the main objective of this study.

The experimental work was done using the following powdered cow milk samples: "Molico" of the Nestlé and "Aptamil Júnior" of Milupa.

Some experiments were done to study the degradability of commercial β -LG and milk samples using enzymatic hydrolysis with trypsin. In this experiments different conditions entailing ultrasonication were assayed.

Different ultrasonic equipment (Tweeter, UTR200, Sounding lead UP50H, Transsonic TI-H-5), was used to evaluate its effectiveness and applicability in the acceleration of the enzymatic digestion of β -LG.

To confirm the hydrolysis of the β -LG present in the milk samples, the MALDI-TOF-MS and the SDS-PAGE techniques were used.

The processing of milk implies some modifications of its nutritional value, mainly in terms of proteins and vitamins, as well as alterations at the sensorial level. These alterations had been evaluated doing a test of sensorial analysis, confirming alterations in the aspect and flavor.

The ultrasonic device Tweeter was not able to promote the complete enzymatic digestion for the protein β -LG neither for the milk samples.

Regarding the acceleration of the enzymatic digestion using the sonication device UTR200, the results showed the necessity of performing the previous reduction and alkylation of the protein, to obtain the enzymatic digestion in short times.

Concerning sonication device UP50H the results obtained were similar to the ones get it with the UTR200.

Lista de Abreviaturas e símbolos

2D – bi-dimensional

α -LA – Alfa-lactoglobulina

β -LG – Beta-lactoglobulina

CNBr - brometo de cianogenio

Da - Dalton

DTT - DL-ditiotreitol

FAO - Food and Agriculture Organization

g – grama

GMP - Glicomacropéptido

GOS – Galacto-oligossacarídeos

HIFU - High Intensity Focused Ultrasound

HTST - High Temperature-Short Time

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IAA - Iodoacetamida

IEF –Focagem Isoelectrica

INE - Instituto Nacional de Estatística

Kcal - quilocalorias

L-litro

m - minuto

MALDI-TOF-MS - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

mg - miligrama

mm- milimetro

MS - Espectrometria de Massa

Nd – não determinado

PLV - Proteínas do Leite de Vaca

PPM-partes por milhão

RP - Reversed Phase

RP-HPLC-UV Reversed Phase High Performance Liquid Chromatographic – Ultra Violet

S - segundo

SD – Standard deviation

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SR – Sonoreactor

TFA - ácido trifluoroacetico

UHT - Ultra High Temperature

USA – United States of America

UV – Ultra violeta

V - volt

W – watt

WHO – Worl Health Organization

Índice de Conteúdos

1. Introdução e Objectivos	11
1. 1. <i>O leite</i>	11
1.1.1 Importância do leite na alimentação Humana	11
1.1.2 Formas de apresentação do leite na produção alimentar	12
1.1.2.1 Os hidrolizados proteicos no aleitamento.....	13
1.1.3 Composição e propriedades do leite.....	15
1.1.3.1 As proteínas do soro de leite	16
1.1.3.1.1 β -lactoglobulina.....	17
1.1.3.1.2 α -lactoalbumina.....	18
1.1.3.1.3 Outras proteínas do soro de leite.....	19
1. 2. <i>Tratamentos aplicados ao leite</i>	20
1.2.1 Aproveitamento e valorização do soro do leite	20
1.2.2 Digestão de Proteínas	21
1.2.2.1 Digestão química.....	21
1.2.2.2 Digestão enzimática	22
1.2.2.3 Aplicação de microondas	24
1.2.3 Aplicação de ultrasons.....	24
1.2.3.1 Banho de ultrasons	24
1.2.3.2 Sonda de ultra-sons	25
1.2.4 Tratamentos aplicados à β -LG	26
1.2.4.1 Fermentação aplicada a proteínas responsáveis pela alergia ao leite de vaca	27
1.2.4.2 Digestão da β -LG glicolizada com galacto-oligosacarídeos.....	27
1.2.4.3 Hidrólise enzimática com co-precipitados lácteos	28
1.2.4.4 Utilização das altas pressões na digestão da β -LG	28
1. 3. <i>Alterações sensoriais e nutricionais provocadas pelo tratamento aplicado ao leite</i>	28
1.3.1 Análise sensorial	29
1.3.1.1 Tipo de provadores.....	29
1.3.1.2 Tipo de testes.....	30
1.3.2 Alterações sensoriais e nutricionais.....	31
1.3.2.1 Efeitos do tratamento térmico	31
1.3.2.2 Efeitos da sonicação	33
1.3.2.3 Efeitos do tratamento térmico combinado com ultra-sons	34
1.3.3 Determinação do valor nutricional do leite	34
1. 4. <i>Técnicas de avaliação de amostras proteicas</i>	36
1.4.1 Electroforese.....	36
1.4.2 Digestão de proteínas separadas em gel	39
1.4.3 Digestão de proteínas em solução	39
1.4.4 Digestão de proteínas em coluna.....	40

1.4.5	Identificação das proteínas	41
1.4.5.1	Identificação por Peptide Mass Fingerprint.....	41
1.4.5.2	Identificação por anti-corpos	42
1.5.	<i>Objectivos</i>	43
2.	Materiais e Procedimento Experimental	47
2.1.	<i>Amostras testadas</i>	47
2.2.	<i>Sistemas de sonicação</i>	48
2.2.1	Ultra-sonicador, modelo Vial Tweeter UIS250V	48
2.2.2	Sonoreactor, modelo UTR200.....	49
2.2.3	Sonda de ultras-sons, modelo UP50H	49
2.2.4	Banho de ultra-sons, modelo Transsonic TI-H5, da Elma.....	50
2.3.	<i>Parâmetros instrumentais utilizados em MALDI-TOF-MS</i>	50
2.4.	<i>Electroforese SDS-PAGE</i>	52
2.5.	<i>Procedimento de digestão enzimática acelerada de proteínas</i>	53
2.5.1	Digestão enzimática acelerada de proteínas com ultrasonicador Tweeter.....	54
2.5.2	Digestão enzimática acelerada de proteínas com sonoreactor UTR200.....	55
2.5.3	Digestão enzimática acelerada de proteínas com sonda de ultra-sons.....	56
2.5.4	Digestão enzimática acelerada com banho de ultra-sons.....	57
3.	Resultados e Discussão	61
3.1.	<i>Tweeter</i>	61
3.2.	<i>SonoreactorUTR200</i>	64
3.3.	<i>SondaUP50H</i>	65
3.4.	<i>Banhos ultra-sons Transsonic TI-H-5</i>	67
3.4.1	Resultados do teste de degustação.....	67
3.5.	<i>Resumo dos resultados</i>	69
4.	Conclusões.....	73
5.	Perspectivas Futuras	77
6.	Bibliografia.....	81
7.	Anexos.....	87

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação da estrutura da β -LG [57].....	18
Figura 1.2. - Sonicador modelo UIP500 da Hielscher [51].....	26
Figura 1.3 – Sistema completo de electroforese Mini-Protean Tetra da Bio-Rad.....	37
Figura 1.4. – Fotografias de exemplos de géis bi-dimensionais [37].....	38
Figura 1.5. – Espectros da α -LA e β -LG obtidos por MALDI-TOF-MS [54].....	42
Figura 2.1. – Ultrasonicador modelo Vial Tweeter UIS250V [51].....	48
Figura 2.2. – Sonoreactor, modelo UTR200 [51].....	49
Figura 2.3 – Ultrasonicador, modelo UP50H [51].....	50
Figura 2.4 – Banho de ultra-sons [52].....	50
Figura 2.5 – Fotografia da aplicação da amostra na placa de Maldi [55].....	51
Figura 2.6 – Tina e cassette de electroforese utilizados.....	52
Figura 2.7 - Kodak Gel Logic 1000 [53].....	53
Figura 3.1 – Fotografia de gel poli-acrilamida SDS-PAGE 12,5% Glicina. Identificação dos poços: 1- Padrão; 2- β -LG; 3,4- β -LG com tratamento e sem digestão; 5,6- β -LG com tratamento + SR 30s sem tripsina; 7,8- β -LG com tratamento + digestão enzimática + SR 30s; 9,10- β -LG com tratamento + digestão enzimática + SR 60s	64
Figura 3.2 –Fotografia de gel poli-acrilamida SDS-PAGE Tris-Tricina 10 e 15%. Identificação dos poços: 1- Padrão; 2- β -LG; 3 e 4- β -LG sem tratamento + tripsina 60s; 5 e 6- β -LG com tratamento + SR 30s; 7 e 8- β -LG com tratamento +SR 60s + tripsina.....	65
Figura 3.3 – Fotografia de gel poli-acrilamida SDS-PAGE Tris-Tricina 20%. Identificação dos poços: 1- Padrão; 2- Tripsina; 3- β -LG; 4- Leite; 5- leite +Sonda 6m; 6- leite +Sonda 2m + tripsina; 7- leite +Sonda 4m + tripsina; 8- leite +Sonda 6m + tripsina; 9- leite + tripsina 6m; 10- β -LG +Sonda 6m + tripsina.....	66

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. – Composição dos leites “Molico” da Nestlé e “Aptamil Júnior” da Milupa.....	47
Tabela 3.1 – Legenda dos tipos de tubos utilizados para cada ensaio.....	61
Tabela 3.2 – Comparação dos resultados obtidos na digestão enzimática acelerada pelo Tweeter a 50% nos vários poços do ultrasonicador (A-H); (nd- não determinado)	62
Tabela 3.3 – Comparação dos resultados obtidos na digestão enzimática acelerada pelo Tweeter a 90% nos vários poços do ultrasonicador (A-H).....	62
Tabela 3.4.– Massas relativas do padrão de proteína:Low Molecular Weight 174661 da GE..	64
Tabela 3.5 – Massas relativas do padrão de Proteína: Polypeptide da Biorad.....	65
Tabela 3.6 – Resultados da prova de degustação do leite tratado com e sem tratamento.....	67
Tabela 3.7 – Escala de avaliação utilizada na prova de degustação.....	68
Tabela 3.8. – Resumo das condições de tratamento aplicado com digestão combinada com sonicação e resultados obtidos.....	69

1 – Introdução

1. Introdução e Objectivos

1. 1. O leite

O leite foi desde sempre e continua a ser um alimento com um peso importante na alimentação a nível mundial.

O seu valor nutritivo e a sua vasta aplicação a nível industrial será revista e descrita ao longo deste capítulo.

Devido às inúmeras soluções no seu tratamento e a diversas formas de avaliar as suas alterações é feita uma descrição dos resultados da pesquisa realizada e do que foi poderado realizar no início deste trabalho

1.1.1 Importância do leite na alimentação Humana

O leite tem vindo a assumir um papel cada vez mais importante na nossa alimentação. Desde os tempos mais remotos em que era usado apenas como um simples alimento altamente nutritivo e importante fonte de proteína completa, aos dias actuais em que, com o recurso à tecnologia mais recente, é amplamente explorado, conseguindo-se obter do soro do leite, péptidos bio-activos, utilizados em diversas aplicações desde a medicina à indústria alimentar.

O leite foi na primeira metade do século XX, do ponto de vista sócio-económico, uma importante fonte de proteína, quando a carne ou o peixe escasseavam ou eram inacessíveis a uma camada populacional. Assumiu assim um papel importante para suprir algumas carências proteicas, uma vez que o seu custo era mais baixo que outras fontes de proteína animal, como a carne, o peixe ou o queijo.

Nessa altura o consumo de leguminosas, cereais e hortícolas, importantes fontes de proteína vegetal, era mais elevado, mas tratando-se de proteínas desequilibradas ou incompletas, o seu consumo era insuficiente para garantir um aporte completo de proteína.

Na segunda metade de século XX o consumo de leite aumentou, com a industrialização deste, sendo atribuído um grande contributo ao leite tratado termicamente (esterilizado, pasteurizado e ultra-pasteurizado) e aos derivados do leite.

Consultando as balanças alimentares publicadas pelo INE (Instituto Nacional de Estatística) de 1994 e 1999, verifica-se um aumento no consumo de leite em especial na população urbana, idosa a viver sozinha e do sexo feminino [5,6].

Apesar de alguma confusão em relação à interpretação das recomendações do seu consumo, este deve ser ingerido diariamente, directa ou indirectamente, na forma de produtos proteicos obtidos pela fermentação, como o caso dos iogurtes ou queijos.

As necessidades diárias variam entre duas a três porções, correspondendo a uma porção 250ml de leite ou 250g de iogurte ou 1 queijo fresco [7].

Em relação à ingestão de queijos curados tem que se ter em conta a presença de valores mais elevados de gordura e sódio.

Actualmente também é elevado o consumo de sobremesas lácteas, alguns destes produtos são obtidos a partir das proteínas do soro do leite, mas também usualmente apresentam adição de açúcar e natas o que altera profundamente o valor nutricional desses produtos. Assim, o valor calórico destes produtos aumenta muito devido aos açúcares simples e gordura. Esta situação que podia contribuir apenas para uma maior diversidade de oferta, não fosse o consumo excessivo principalmente por uma população infantil.

Por um lado os noticiários referem de forma preocupante o problema da obesidade infantil, mas por outro assistimos cada vez mais a uma maior oferta de produtos desequilibrados do ponto de vista nutricional, dirigidos de forma descarada a uma camada infantil. Esta conduta leva a uma substituição dos alimentos que deviam ser consumidos diariamente, como leite, iogurte, pão e fruta, na escola ou em casa, tornando-se de facto uma questão não só preocupante como alarmante se nada se fizer.

Quando analisamos as estatísticas podemos verificar um aumento no consumo de leite na população em geral [5,6]. Para este resultado contribui principalmente o consumo elevado na população idosa e infantil, e por outro lado o aumento do consumo de sobremesas lácteas.

Quanto ao consumo de iogurte também tem vindo a aumentar, muito pela importância que tem vindo a ser atribuída em relação aos seus benefícios para a saúde, para a qual tem contribuído a divulgação de estudos científicos. O iogurte é mais consumido por adultos e crianças, uma vez que a faixa etária mais idosa apresenta mais resistência ao consumo deste derivado preferindo o leite [5,6].

1.1.2 Formas de apresentação do leite na produção alimentar

O leite é comercializado em várias apresentações, após sofrer diferentes tratamentos que lhe conferem determinados prazos de durabilidade, mais ou menos extensos, e que implicam diferentes graus de modificação do leite inteiro natural.

Leite pasteurizado: é aquecido a temperaturas entre 62,8°C a 65,6°C durante 30 minutos, também pode ser aquecido a 72°C durante 15 segundos, este tratamento de curta duração é conhecido por High Temperature-Short Time - HTST, é hoje o processo mais frequentemente utilizado porque optimiza características organolépticas e valor nutricional[8].

Leite UHT – (Ultra High Temperature): o leite é centrifugado, aquecido bruscamente a temperatura elevada (130 a 150°C) através do contacto com vapor durante um intervalo de tempo muito curto, homogeneizado e embalado assepticamente [8].

Leite esterilizado: o leite é centrifugado, homogeneizado, acondicionado e aquecido de forma a ficar isento de microrganismos susceptíveis de nele se desenvolverem e também a não sofrer alteração sensível da sua constituição química [8].

Leite em pó: obtido a partir de leite pasteurizado, o leite é concentrado em vácuo entre 50 e 55°C. Posteriormente, é submetido a um processo de evaporação da água, em cilindro aquecido a 140°C ou por atomização (jactos de leite são postos em contacto com correntes de ar quente, a 170°C). Este tipo de leite apresenta menos de 4% de água [9].

Existem também no mercado fórmulas de substituição de leite, que são no fundo hidrolizados do leite de vaca adaptados à nutrição do lactente.

Apesar dos benefícios obtidos com a ingestão do leite podem surgir algumas complicações como a possibilidade de desencadear reacções de alergia.

1.1.2.1 Os hidrolizados proteicos no aleitamento

O aleitamento materno é sem dúvida a melhor, mais adequada e completa fonte alimentar para o lactente. No entanto para os casos em que este não é possível, como acontece no caso de doença infecciosa da mãe, exposição radioactiva ou determinados tipos de medicação (antibióticos, anti-inflamatórios ou quimioterapia), o papel dos hidrolizados do leite de vaca é de extrema importância para garantir o aporte adequado de todos nutrientes essenciais para as necessidades do lactente.

Também pode ser contra-indicado o aleitamento materno nos casos de distúrbio metabólico congénito em que o recém-nascido não possui a capacidade de metabolizar determinado aminoácido presente no leite. Uma vez que o leite como fornecedor de aminoácidos determinantes para um normal desenvolvimento, possui todos os aminoácidos

essenciais, incluindo o responsável pelo distúrbio torna-se complicado manter a sua ingestão. O objectivo da ingestão destes hidrolizados, neste tipo de distúrbios é o de minimizar as consequências, que seriam de maior gravidade com a ingestão de um alimento que apesar de completo provocaria interferências na assimilação dos outros nutrientes e toxicidade pela acumulação dos nutrientes não metabolizados.

Neste tipo de desordens, as complicações ao nível do desenvolvimento físico e mental acabam por surgir seja pelas carências nutritivas, seja pela acumulação e toxicidade dos metabolitos no tecido nervoso [10].

Os hidrolizados proteicos desprovidos do aminoácido responsável pelo distúrbio, permitem assim, digerir e assimilar todos os outros nutrientes [11].

Os casos clínicos mais frequentes são a fenilcetonúria [10] e homocistinúria.

No primeiro caso o distúrbio ocorre pela falta total ou parcial da fenilalanina hidroxilase hepática, o que não permite metabolizar a fenilalanina em tirosina. A incidência é de 1 em cada 11.000 recém-nascidos em Portugal [12], sendo em Minas Gerais, Brasil a prevalência de 1 para 15.000 recém-nascidos [10].

Este distúrbio detecta-se com o teste do pézinho logo nas primeiras semanas de vida.

A fenilalanina hidroxilase hepática é constituída por duas cadeias de polipeptídeos, cada uma com uma massa molecular de 54 kDa. Entretanto já foram identificadas formas multiméricas da enzima, com massas moleculares entre 200 e 250 kDa, sugerindo a existência de uma forma tetramérica. O gene que codifica a enzima está localizado no cromossoma 12. Foram descritas mais de 328 mutações, incluindo polimorfismos, no gene desta enzima. Algumas mutações causam ausência total da função da enzima, outras estão associadas a uma actividade residual [10].

O quadro clínico de pacientes com este distúrbio metabólico caracteriza-se por um atraso geral no desenvolvimento neuro-psicomotor, deficiência mental, comportamento agitado ou padrão autista, convulsão [12] e urina com odor característico e cor esverdeada.

O segundo caso, a homocistinúria, menos frequente, ocorre devido à falta da cisteína redutase que converte a metionina em homocistina e posteriormente em cisteína. Quando a enzima não actua acumula-se homocistina no sangue tendo como consequências atrasos no desenvolvimento, trombozes arteriais e venosas. Recentemente têm-se associado níveis elevados de homocistina como mais um indicador na incidência de doença cardiovascular.

A estratégia da terapêutica em ambos os casos, passa por eliminar da dieta fontes que contenham o aminoácido responsável pelo distúrbio metabólico, recorrer a outras fontes

proteínas e a hidrolizados de proteína de forma a evitar carências de outros aminoácidos que inevitavelmente se eliminam juntamente com as restrições proteicas.

1.1.3 Composição e propriedades do leite

O leite apresenta uma composição vasta, fornecendo: um bom aporte de proteína completa e equilibrada (alto valor biológico); lactose; triglicéridos; colesterol; dependendo do teor de matéria gorda: gordura, maioritariamente saturada; maioria das vitaminas, em maior quantidade, vitaminas lipossolúveis (A, D e K), vitamina B12, algumas vitaminas hidrossolúveis (riboflavina, piridoxina); maioria dos minerais, em maior quantidade, cálcio e fósforo [13].

A relação cálcio-fósforo é próxima do ideal, ou seja favorável a uma boa assimilação e sinergia na actuação destes minerais. No entanto a relação entre cálcio-magnésio já é desproporcional. Neste caso deveria ser o dobro da concentração de cálcio para a de magnésio, tal não se verificando pode ter como consequência um aumento na excreção de cálcio ou deficiente assimilação de magnésio [13].

Como deficiências nutricionais do leite regista-se a falta de ferro e manganésio e de vitaminas C e E [13].

Muitos dos componentes do leite apresentam propriedades às quais se atribuem determinadas funções no nosso organismo. Em seguida listam-se alguns dos componentes fisiologicamente activos do leite e suas funções:

- Ácido butírico : Ácido gordo de cadeia curta, também produzido pela flora intestinal. Estudos recentes têm atribuído um papel anti-inflamatório e protector no cancro do cólon e da mama. É atribuído também um efeito prebiótico, uma vez que estimula o crescimento das Bifidobactérias e *Lactobacillus* [14].
- Cálcio: Para além da sua função estrutural no tecido conjuntivo/ ósseo desempenha um papel importante na regulação do tecido conjuntivo e tensão arterial [14].
- Conjugados do ácido linoleico (CLA): Termo usado para designar os isómeros do ácido linoleico presentes na gordura dos ruminantes. São produzidos naturalmente por hidrogenação no rúmen. Os efeitos que são atribuídos a estes ácidos gordos passam pelo aumento de massa magra, tendo um efeito regulador importante na composição corporal; na diabetes; nas dislipidémias; na aterosclerose; na modulação do sistema imunitário, podendo estar implicado na prevenção de alguns cancros, [14] apesar de ainda existirem poucos estudos.

- Esfingolípidos: Importância estrutural no sistema nervoso central; Efeitos inibidores da carcinogénese, redução no colesterol e triglicéridos.
- Lactoferrina , Lactoperoxidase, Imunoglobulinas, Lisozima: Factores imunológicos [15, 16].
- Prebióticos (Oligossacarídeos): Alimentam a flora intestinal [15].

Existem ainda no leite, na sua forma natural, péptidos que por lhes serem atribuídas funções fisiológicas, são denominados de **péptidos bioactivos**, como a casopiasina que tem actividade anti-trombótica [16,17,18], a casomorfina com acção anti-diarreica [1,16,19] e a lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase que apresentam actividade anti-microbiana e anti-viral [16,19,20]. São ainda atribuídas aos péptidos bioactivos várias outras funções como: inibidores da angiotensina, hipertensores [17,18], anticoagulantes [20], hipocolesterolémicos [20], capazes de alterar a distribuição de gordura [21], actividade antioxidante, promovendo a absorção de cálcio e possuindo um efeito anti-carcinogénico [1, 19], ergogénicos [20], imunomoduladores [16,20].

1.1.3.1 As proteínas do soro de leite

O soro do leite é o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína (representa 80% da proteína total do leite) [20]. Os principais componentes do soro, são a lactose, as proteínas solúveis, os lípidos e os sais minerais [20]. Dos vários produtos obtidos a partir do leite o queijo é um dos principais. Para o fabrico de queijo, obtem-se como subproduto o soro, sendo que para cerca de 1Kg de queijo resultam aproximadamente 9Kg de soro [20].

Inicialmente o soro era considerado um subproduto do fabrico de queijo, de baixo valor comercial, com aplicação na alimentação animal ou descarregado em efluentes sem o respectivo tratamento[1,22]. Pelo elevado teor de matéria orgânica, os efluentes desta produção representavam uma fonte de poluição [22].

Actualmente com o desenvolvimento da tecnologia e a progressiva descoberta das propriedades funcionais dos péptidos obtidos a partir do soro, a tendência é de valorizar o soro com aplicação na formulação de diversos géneros alimentícios ou fórmulas concentradas de proteínas [1,20].

A composição do soro é variável, depende do procedimento de separação da caseína, podendo-se obter um soro ácido ou um soro doce. O soro doce é obtido no processo de coagulação enzimática enquanto que o soro ácido é obtido pela precipitação ácida ao pH

isoeléctrico. O soro ácido contém maior teor de minerais e menor conteúdo de proteínas, sendo a sua utilização na alimentação mais condicionada devido ao sabor ácido e elevado teor salino [20,22].

Em termos de necessidades de aminoácidos essenciais, as revisões da FAO/WHO (Food and Agriculture Organization e World Health Organization) estabelecem dois padrões de necessidades, uma para crianças com idade inferior a 2 anos, que corresponde à composição do leite materno e um segundo padrão para as idades seguintes, obtido com base na taxa de oxidação de aminoácidos em função dos níveis ingeridos [20].

As proteínas do soro apresentam praticamente todos os aminoácidos essenciais com valores acima das recomendações nutricionais da FAO/WHO, excepto para a fenilalanina e tirosina [1,20].

As proteínas do soro apresentam uma elevada concentração de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), o mesmo tipo de aminoácidos que se encontram em elevada quantidade nas proteínas vegetais e que apresentam a vantagem de serem rapidamente utilizados na síntese proteica dos tecidos magros, mais solicitados no esforço físico. Esta característica faz com que sejam utilizados em suplementos proteicos na forma de batidos para a prática de musculação ou outras actividades físicas mais específicas.

Os péptidos obtidos pela digestão enzimática das proteínas do lactosoro preservam as suas propriedades, como se pode verificar num estudo experimental em que se observou a recuperação de ratos sujeitos à privação de alimentos durante 72 horas, verificando-se que fornecendo um hidrolizado enzimático de proteínas do lactosoro durante 48 horas, o ganho de peso era semelhante àquele que tinha ocorrido com ratos alimentados com proteínas inteiras, com a vantagem de se obter uma maior retenção de azoto no primeiro grupo de ratos [23, 24]. Resultados semelhantes foram obtidos para os hidrolizados de lactosoro comparativamente a aminoácidos livres [25].

O soro de leite contém na sua composição, como referido anteriormente várias proteínas solúveis que se descrevem em seguida.

1.1.3.1.1 β -lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -LG), com um peso molecular de 18,3kDa, que pode variar entre os 18,4kDa e os 36,8 kDa (forma dimérica), é a proteína que está presente em maior quantidade no leite de ruminantes e porcos, cerca de 12% da proteína total do leite bovino e 50% da proteína do soro [1,20].

Apresenta polimorfismo genético, sendo as variantes A e B as mais comuns. Tem uma estrutura primária de 162 aminoácidos [20]. Em solução, com pH entre 3,5 e 5,2, a β -LG associa-se para formar octâmeros. Quando o pH é superior ao ponto isoelétrico (5,2) a forma predominante passa a ser a dimérica. Finalmente, quando $3,5 > \text{pH} > 6,5$ as formas multiméricas começam a dissociar-se devido a repulsões electrostáticas [1].

Sabe-se que se liga ao cálcio e ao zinco e que participa no transporte de retinol [20].

A estrutura da β -LG, que se encontra representada na figura 1.1. com as suas hélices α e folhas β , é globular tornando-a mais resistente aos ácidos gástricos e enzimas proteolíticas [20].

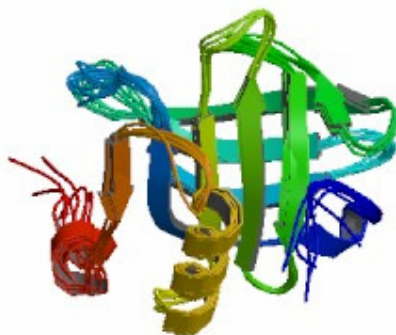


Figura 1.1 – Representação da estrutura da β -LG [26]

1.1.3.1.2 α -lactoalbumina

A α -lactoalbumina (α -LA) é a segunda proteína do soro, em concentração, estando presente no leite de praticamente todos os mamíferos, com uma representatividade de cerca de 25% das proteínas do soro. A proporção de α -LA e β -LG no leite bovino é de 1:3 [1,20].

Trata-se de uma proteína globular e apresenta-se como monómero ao pH do leite (6,6) [20].

É uma pequena e compacta metaloproteína com um peso molecular de 14,1 kDa e apresenta uma forte afinidade para os iões de cálcio [1].

A função da α -LA é a de modular a especificidade da galactosiltransferase no complexo lactose sintetase que tem como objectivo catalisar a biosíntese da lactose no tecido mamário [20].

1.1.3.1.3 Outras proteínas do soro de leite

Entre muitas proteínas do soro de leite, cerca de sessenta, entre as quais lipases e proteases, podemos destacar algumas referidas detalhadamente em seguida:

Imunoglobulinas: Produzidas pelos linfócitos B, existem três classes no leite bovino: IgG, IgM e IgA, são factores importantes no processo de mediação da resposta imunológica à invasão de corpos estranhos no organismo [1].

Estruturalmente são compostas por duas cadeias mais leves de 23 kDa e duas cadeias mais pesadas de 53 kDa [1].

Albumina do soro: Acumula-se no leite a partir do soro sanguíneo e liga-se aos ácidos gordos, mas desconhece-se a sua função biológica [1].

Estruturalmente é composta por 582 aminoácidos, com um peso molecular aproximado de 66,3 kDa [1].

Lactoferrina: Sintetizada pelos neutrófilos, possui uma cadeia de 689 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 80 kDa [1].

Trata-se de uma glicoproteína que para além do leite está presente nas secreções das glândulas exócrinas, do aparelho digestivo, respiratório e reprodutor, no sangue, nas lágrimas e no líquido sinovial. Esta localização demonstra a importância na defesa contra invasores patogénicos [1].

Lactoperoxidase: Estruturalmente é composta por 612 aminoácidos com um peso molecular de 78,4 kDa [1].

Pertence à família das peroxidases, participando em reacções oxidativas, em que o peróxido de hidrogénio é um dos reagentes, originando espécies reactivas com actividade microbiana [1].

Glicomacropéptido: Inexistente no soro ácido, representa cerca de 15 a 20% do total das proteínas do soro doce. O Glicomacropéptido (GMP) também é libertado no estômago por acção da pepsina sobre a k-caseína após a ingestão de lacticínios [1].

Pode ter um papel importante na protecção contra a agressão de microorganismos patogénicos [1].

Lisozima: Com um peso molecular de 15 kDa, trata-se de uma enzima que cataliza a hidrólise de ligações entre componentes da parede celular de bactérias[1].

1. 2. Tratamentos aplicados ao leite

São aplicados ao leite diversos tratamentos com diferentes objectivos, por um lado para a obtenção de produtos funcionais e adaptados a necessidades específicas como situações de alergias e por outro tratamentos que visam melhorar aspectos industriais e tecnológicos.

1.2.1 Aproveitamento e valorização do soro do leite

As proteínas do soro do leite contêm várias sequências de aminoácidos com propriedades bioactivas, a sua hidrólise pode libertar péptidos com actividade funcional acrescida [1,20].

A libertação dos péptidos das proteínas do lactosoro ocorre naturalmente pela acção das enzimas presentes no tracto digestivo. No entanto com tratamento do lactosoro com enzimas proteolíticas ou com microrganismos com actividade proteolítica, pode conseguir-se a libertação de maior quantidade de péptidos [1]. Estes podem ser valorizados, ao serem incorporados em produtos alimentares, contribuindo para o seu enriquecimento ou para a produção de concentrados de proteína ou produtos com uma função mais específica à base de péptidos bio-activos, podendo assim ser considerados alimentos funcionais [1].

Podemos definir alimento funcional “quando for satisfatoriamente demonstrada a acção benéfica em uma ou mais funções orgânicas, para além dos efeitos nutricionais adequados, relevantes para um estado de saúde melhorado e/ou redução do risco de doença” [1].

Os hidrolizados de proteínas com aplicação directa ou como ingredientes de alimentos ou géneros alimentícios têm um elevado potencial de aplicação quer do ponto de vista nutricional, quer com aplicação a nível tecnológico[1]. Neste último caso podem ser utilizados no desenvolvimento de aditivos que tenham uma função a nível da produção de géneros alimentícios ou a nível organoléptico, por exemplo, facilitar a solubilidade em misturas, com acção emulsionante, facilitar a produção na obtenção de uma textura mais cremosa [20]; produção de embalagens ou revestimentos comestíveis, combinando as capacidades de gelificação das proteínas do soro com plastificantes específicos, como por exemplo o sorbitol ou glicerol, obtendo bio-filmes de permeabilidade diversa e

consequentemente adaptações a diferentes aplicações alimentares [28]. A sua prestação pode ainda ser melhorada através da adição de agentes microbianos (bacteriocinas, ácidos orgânicos ou quitosanos), que assegurem uma conservação mais eficaz dos alimentos embalados [28] ou permitam uma menor utilização de aditivos alimentares.

Ao nível promoção da saúde existem leites fermentados no mercado mundial, com provada acção anti-hipertensora, “Ameal”; “Evolus” e “Biozate”, [1] também com actividade hipocolesterolémica – “Becel Pró-active” [11].

Para a obtenção destes produtos funcionais podem ser aplicados diferentes tratamentos ao leite, como se descreve em seguida.

1.2.2 Digestão de Proteínas

A digestão de proteínas pode ter como finalidade obter um produto mais digerível e com menor grau de alergenicidade. A digestão corresponde a uma hidrólise parcial ou completa e pode ser conseguida por diferentes métodos, térmicos, químicos, com ácidos ou bases, ou por via enzimática.

1.2.2.1 Digestão química

As técnicas de digestão química aplicadas a amostras proteicas alimentares como o leite, são inespecíficas, recorrendo a ácidos e bases. Podem ter como consequência hidrolisar aminoácidos, como o triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor biológico da proteína [20].

O processo por meio de hidrólise ácida pode revelar-se mais eficaz, mas por uma questão de oferecer maior segurança alimentar ao consumidor e ir de encontro aos seus receios, procurou-se otimizar um processo não químico, também para evitar algumas desvantagens na alteração do sabor (mais salgado, devido à adição de hidróxido de sódio para anular o ácido clorídico) [29].

1.2.2.2 Digestão enzimática

A digestão ou hidrólise enzimática pode contribuir para uma melhoria das propriedades funcionais dos produtos lácteos obtidos, principalmente a nível da solubilidade [30], poder emulsionante e textura dos géneros alimentícios [20]. Também a aplicação dos ultra-sons pode aumentar a solubilidade das proteínas.

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas através da hidrólise enzimática, pela distribuição quanto ao tamanho dos péptidos uma vez que o comprimento da cadeia peptídica influencia a taxa de absorção [20]. A absorção de oligopeptídeos pelo organismo é superior à de uma mistura de aminoácidos livre ou proteína intacta [20].

O grau de hidrólise aplicado é importante, sendo relatado nos estudos pesquisados que uma hidrólise branda pode ser útil ao passo que uma hidrólise extensiva pode ser desvantajosa [30]. Se por um lado uma hidrólise parcial pode disponibilizar péptidos que estavam inacessíveis no leite, alguns péptidos bioactivos podem perder-se com uma hidrólise mais extensa e assim o produto final perder propriedades funcionais.

A qualidade e características finais do hidrolizado proteico dependem de diversos factores que devem ser controlados de forma a obter os resultados pretendidos, desde a natureza e associação das enzimas, pH, temperatura, tempo da hidrólise, tipo e concentração de substrato, relação enzima/substrato, inactivação da enzima no fim da digestão [20].

A utilização de proteases específicas, como a tripsina, apresenta algumas vantagens sobre a digestão química, como a especificidade; o controlo da hidrólise; as condições moderadas pouco agressivas do tratamento; menor conteúdo de sais no hidrolizado final; menor formação de subprodutos; menor presença de resíduos que possam conferir alterações de sabor ou mesmo paladar desagradável no produto final, ou até mesmo que possam inviabilizar o consumo desse produto, no caso de se tratar de processamento de alimentos ou géneros alimentícios. [20]

As proteases têm sido utilizadas ainda para a modificação de proteínas em alguns alimentos como no caso da soja e outros vegetais, de forma a obter proteína texturizada ou concentrados de proteína; para a solubilização de concentrados de peixes; a papaína e bromelaína no amaciamento de carnes; na melhoria da textura de queijos; aumentando significativamente a qualidade e valor nutricional dos produtos [20].

A escolha da enzima proteolítica é de extrema importância uma vez que a sua acção específica vai influenciar a composição final dos produtos obtidos da hidrólise, principalmente em relação ao tamanho médio dos péptidos [20].

Estudos recentes referem hidrólises completas na α -LA, com a utilização da tripsina, papaína e bromelaína sem a presença de cálcio na amostra e hidrólises incompletas com a tripsina e pancreatina na presença de cálcio [20].

Em relação à β -LG a pancreatina apresentou uma hidrólise completa sem a presença de cálcio e a tripsina uma hidrólise incompleta também sem a presença de cálcio. Verificou-se ainda que com um pré-aquecimento durante 8 minutos a 82°C a papaína obteve uma hidrólise mais rápida sobre a β -LG [20].

Após a digestão da β -LG pela tripsina com uma hidrólise completa resultam 18 péptidos [27].

A tripsina, com um peso molecular de 23,29 kDa, apresenta actividade catalítica a um pH entre 7 e 10, sendo o seu pH óptimo perto dos 8. É muito utilizada para a digestão de proteínas também porque hidroliza as proteínas exclusivamente depois de resíduos de arginina ou lisina, de modo reprodutível, obtendo-se péptidos com um tamanho médio de 800 a 2000 Da [29, 31].

Contudo o processo enzimático não está isento de inconvenientes, uma vez que durante o processo de hidrólise com a libertação de aminoácidos hidrofóbicos pode contribuir para o desenvolvimento de gosto amargo. Tal situação representa um dos principais obstáculos na aplicação generalizada dos hidrolizados [20,29].

No entanto, alguns procedimentos podem ser utilizados para mascarar o sabor amargo desenvolvido nos hidrolizados enzimáticos. São exemplos a adição de compostos para diminuir o sabor amargo; aplicação de cromatografia hidrofóbica; adsorção de péptidos amargos, hidrólise com exopeptidases; adição de *Lactobacillus*; formação de pasteína; tratamento com carvão activado e extração [20].

A encapsulação da tripsina em lipossomas e em lipoesferas também pode apresentar-se como uma solução para mascarar o sabor amargo [20].

É importante diferenciar outro tratamento enzimático que se aplica ao leite, o caso da adição de lactase para a redução parcial ou total da lactose. Estes leites destinados a intolerantes à lactose, adquirem um sabor mais doce pelo facto de a lactase desdobrar a lactose em açúcares mais simples como a galactose e glicose.

1.2.2.3 Aplicação de microondas

A aplicação das microondas na digestão enzimática permite uma aceleração do processo.

Com esta metodologia foram conseguidos tempos de digestão necessários para a digestão completa da α -LA de cerca de 20 minutos [2]. São recomendados níveis de baixa potência de irradiação, cerca de 30% do potencial nominal do micro-ondas, de forma a evitar a perda de controlo da temperatura da digestão [2].

O tempo e amplitude de irradiação e a temperatura atingida pela solução são parâmetros decisivos para se obter um bom resultado [2].

Outra técnica que se utiliza também em conjunção com a digestão enzimática é a aplicação de ultrasons.

1.2.3 Aplicação de ultrasons

Este tipo de tecnologia pode oferecer múltiplas aplicações desde o estudo analítico em laboratório à aplicação em escala industrial. Para tal é necessário ajustar capacidade de volume e as condições de operação, como a potência e a frequência.

Em laboratório estes equipamentos podem ser usados na preparação de amostras, na etapa da diluição, mistura, emulsão, ruptura ou lise de tecidos ou de microorganismos [32].

Os processadores à escala industrial permitem potências superiores, com aplicações para testar a optimização de processos líquidos, como a mistura ou a redução do tamanho de partículas ou desintegração de material orgânico [32].

Para a aplicação de ultrasons podem utilizar-se diferentes equipamentos como se descreve em seguida.

1.2.3.1 Banho de ultrasons

Um banho de ultra-sons é um aparelho comum num laboratório, no entanto não é uma ferramenta poderosa uma vez que o seu poder de irradiação é baixo [2] e a distribuição da intensidade dos ultra-sons pode não ser a mais homogénea [3].

Devem-se ter em conta algumas variáveis antes de efectuar a sonicação: o tamanho da partícula; o tempo de sonicação; a frequência da energia de sonicação; a temperatura da água dentro do banho; o uso de detergente na água do banho, o que permite uma melhor transmissão dos ultra-sons pelo líquido, obtendo-se melhores resultados [3].

Estes aparelhos podem funcionar no intervalo entre 25 a 45kHz ou 35 a 130kHz, mas apenas num intervalo de cada vez [3].

Equipamentos mais recentes oferecem soluções mais flexíveis, como o facto de trabalharem a multi-frequências usando o mesmo tempo de sonicação a diferentes frequências, 25 e 40kHz. Desta forma consegue-se obter uma distribuição dos ultra-sons mais uniforme [3].

Também existem outras soluções nos equipamentos de banhos de ultra-sons que permitem trabalhar com volumes mais elevados como acontece com o modelo TI-H-160 da Elma, com capacidade para 135 litros e diferentes frequências de sonicação, 25 e 45kHz ou 35 a 130kHz [33].

1.2.3.2 Sonda de ultra-sons

A aplicação de ultra-sons focalizados de alta intensidade (*High Intensity Focused Ultrasound*-HIFU) permite acelerar a digestão das proteínas tornando o processo da identificação de proteínas mais célere [2,3,4].

Neste caso é importante ter em conta o diâmetro da sonda, o volume da amostra, o tempo, amplitude e frequência de sonicação, a concentração da enzima e a temperatura da solução onde ocorre a digestão [2].

Podem-se encontrar modelos de sondas com diferentes diâmetros e modelos de multisondas, que permitem a sonicação simultânea de várias amostras. No caso do modelo SLPe da Branson Ultrasonic Corporation, USA, com as suas quatro sondas, permite a análise de quatro amostras em simultâneo. Este sistema será incorporado como elemento opcional na terceira geração de robots digestores para aplicação proteómica da companhia *Genomic Solutions* (www.genomicsolutions.com) [2].

O modelo UIP500 da Hielscher permite um funcionamento em contínuo na aplicação dos ultra-sons numa dada amostra ou produto, com uma capacidade de 100 litros por hora, uma solução próxima da escala industrial. Este aparelho funciona com uma frequência de 20 kHz, o que têm como consequência uma intensa cavitação em líquidos, o que pode ser uma limitação na sua aplicação em produtos sensíveis como o leite.

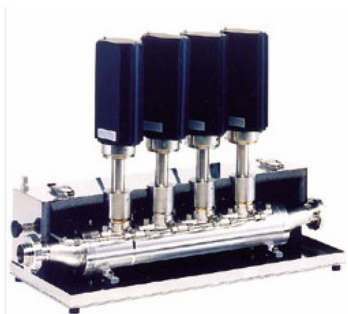


Figura 1.2 – Sonicador modelo UIP500 da Hielscher [32]

1.2.4 Tratamentos aplicados à β -LG

A alergenicidade atribuída às proteínas do leite de vaca (PLV), essencialmente à β -lactoglobulina, afecta cerca de 1 a 2% em crianças com menos de 2 anos [1], que é algo compreensível já que se trata de uma proteína inexistente no leite materno.

A alergenicidade desta proteína está associada à resistência da sua forma nativa à acção da pepsina e à existência de pequenos aglomerados de aminoácidos hidrofílicos que apresentam uma acção antigénica (epítomos) [1].

A redução da alergenicidade passa por alterar a conformação inicial da proteína e assim aumentar a susceptibilidade à acção da pepsina (de forma a aumentar a digestibilidade) e/ou por reduzir a presença de antigénicos, recorrendo a diversos tipos de tratamento como o recurso à acção de enzimas proteolíticas nomeadamente à tripsina [1].

A hidrólise das proteínas com extensão que possibilite a redução do peso molecular para 5 a 2 kDa, reduz para o mínimo a alergenicidade residual das proteínas do soro. No entanto a especificidade da enzima pelas zonas epitóticas (antigénicos) da proteína parece ser o factor determinante na redução da alergenicidade. Neste contexto a tripsina parece ser uma das opções mais viáveis [1].

De seguida apresentam-se alguns exemplos de tratamentos aplicados ao leite de modo a reduzir o conteúdo em β -LG.

1.2.4.1 *Fermentação aplicada a proteínas responsáveis pela alergia ao leite de vaca*

Num estudo da fermentação de leite desnatado e de soro de leite com uma mistura de um para um de *Lactobacillus* e *Streptococcus thermophilus*, verifica-se a redução da quantidade de β -LG, o principal alergénico no leite de vaca, em 90% [34]. Esta pesquisa também pode ter implicações para toda a indústria alimentar, uma vez que o soro de leite e os ingredientes derivados do soro são extensivamente usados em toda uma série de produtos alimentares [34]. A antigenicidade da β -LG no soro de leite foi reduzida em 70%, enquanto no leite desnatado, a redução foi de mais de 90% [34].

1.2.4.2 *Digestão da β -LG glicolizada com galacto-oligossacarídeos*

Os galacto-oligossacarídeos (GOS) são conhecidos como ingredientes prebióticos que podem formar a base de novos produtos de leite funcionais [35].

Foi estudada e caracterizada em condições controladas ($a_w=0,44$; 40°C durante 23 dias), a β -LG glicolizada com prebióticos GOS, produzida através das reacções Maillard [35].

A extensão da glicolização da β -LG é avaliada pela formação de furosina que progressivamente aumenta depois de 16 dias, sugerindo que a formação de compostos Amadori provem da sua degradação [35].

O perfil da β -LG modificado como consequência da sua glicolização é avaliado pelos seguintes métodos de identificação de proteínas: RP-HPLC-UV, SDS-PAGE, Focagem Isoelectrica (IEF) [35].

Utilizando a técnica de MALDI-TOF, o espectro de massa da β -LG glicolizada mostra um aumento aproximadamente de 21% na massa molecular média depois de armazenada por 23 dias [35].

A estabilidade da β -LG glicolizada em estudos de digestão gastro-intestinal estimulada *in vitro* foi descrita e comparada com a proteína não glicolizada. O rendimento dos produtos da digestão da β -LG glicolizada é mais baixo de que o observado para a proteína não glicolizada [35].

A conjugação de hidratos de carbono prebióticos para estabilizar proteínas e péptidos pode abrir novos caminhos para a pesquisa no estudo de ingredientes funcionais [35].

1.2.4.3 Hidrólise enzimática com co-precipitados lácteos

Alguns produtos lácteos magros podem ser produzidos pela co-precipitação por cálcio ou ácido láctico com graus de hidrólise enzimática de 2 a 6%. [30]

Mediante precipitação pela acção do cálcio ou ácido láctico, é possível juntar os diferentes grupos de proteínas lácteas: proteínas do soro e caseínas. Dessa forma é possível aumentar a produção de proteínas obtidas do leite, e obter a valorização de uma série de propriedades funcionais dos alimentos, [30] ou a incorporação dessas proteínas em outros produtos, como sumos de fruta, ou o melhoramento no valor nutricional da proteína do leite ou de outros géneros alimentícios [30].

1.2.4.4 Utilização das altas pressões na digestão da β -LG

A utilização de 400MPa durante 10 minutos aumenta a hidrólise da β -LG com recurso à pepsina. [36] No entanto a utilização de pressões mais elevadas (600 a 800 MPa) resultam numa rápida digestão, com uma redução do tempo de digestão para 1 minuto [36].

Com a aplicação de altas pressões a β -LG pode ficar extensamente hidrolisada pela acção enzimática possibilitando assim a utilização dos péptidos bioactivos [37].

Também se encontram estudos que referem uma associação das altas pressões a proteases de forma a diminuir ou eliminar a antigenicidade das proteínas do leite e do uso dos hidrolizados obtidos na elaboração de fórmulas infantis hipoalergénicas [38].

Em conjunto com as altas pressões também se utilizam as microondas, verificando-se uma maior eficácia do que com o aquecimento convencional [39].

1.3. Alterações sensoriais e nutricionais provocadas pelo tratamento aplicado ao leite

O processamento do leite implica algumas modificações do valor nutricional, principalmente de proteínas e vitaminas, assim como alterações a nível sensorial, descritas no ponto 1.3.1. Estas alterações são determinadas e avaliadas recorrendo a diversas técnicas de análise sensorial (1.3.2.) e de determinação do valor nutricional descritas no ponto 1.3.3.

1.3.1 Análise sensorial

Segundo o projecto de Norma Portuguesa 4263 (1994) podemos definir Análise Sensorial ou Exame Organoléptico como o “*exame das características organolépticas de um produto pelos órgãos dos sentidos*”

A análise sensorial responde a vários tipos de questões:

Descrição

“A que é que sabe o produto?”; “Quais são as suas características sensoriais apercebidas?”; “De que modo a qualidade do produto difere de outro produto?”; “Quais são as consequências de uma modificação no processo, formulação, embalagem ou condições de armazenamento nos atributos do produto?” [40].

Discriminação

“Será que o consumidor nota a diferença?”; “Será que o consumidor detecta isto?”; “Quantos consumidores detectariam esta diferença?”; “Estes produtos são diferentes?”; “Qual a magnitude da diferença?” [40].

Preferência ou Hedónico

“Quantas pessoas gostam deste produto?”; “O produto é aceitável?”; “Este produto é tão bom como o concorrente?”; “Será que este produto é melhor que o anterior?”; “Quais são as características mais apetecidas?”; “Será o preferido pelo consumidor?”.

As provas de análise sensorial são então importantes em estudos de tempo de vida do produto; na aceitabilidade do produto pelo consumidor; na comparação entre produtos concorrentes ou versões diferentes; reformulação do produto; identificação da posição no mercado do produto em relação à concorrência; especificações dos produtos e controlo da qualidade; detecção de cheiros e sabores estranhos ao produto resultantes da contaminação, da interacção com produtos da embalagem (vernizes, tintas, plásticos, ...), ou do processo produtivo [40].

1.3.1.1 Tipo de provadores

Podemos considerar vários tipos de participantes (provadores) nas provas de análise sensorial (prNP 4264:1994; NP ISO 8586-1:2001; ISO 8586-2:1994):

- > Participante ou provador (assessor) – qualquer pessoa que participe num ensaio sensorial;
- > Participante ou provador candidato – qualquer pessoa que, sendo candidata, ainda não tenha participado num ensaio sensorial;
- > Participante ou provador iniciado (initiated assessor) – qualquer pessoa que já tenha participado num ensaio sensorial;
- > Provador – participante perspicaz, sensível, seleccionado e treinado para avaliar mediante os órgãos dos sentidos as características organolépticas dum produto;
- > Provador qualificado (selected assessor) – provador escolhido pela sua capacidade para efectuar um ensaio sensorial;
- > Provador perito (expert) – provador qualificado que, pela sua grande experiência do produto é capaz de efectuar, individualmente ou em júri, a avaliação sensorial desse mesmo produto. [40]

A norma ISO 8586-2:1994 (E) refere a existência de dois tipos de peritos (expert):

- > Provador perito (expert assessor) – provador qualificado com um alto grau de sensibilidade sensorial e experiência na metodologia de análise sensorial, capaz de realizar ensaios consistentes e repetíveis em vários produtos;
- > Provador perito especializado (specialized expert assessor) – provador perito com experiência adicional como especialista no produto e/ou processo e/ou marketing, com capacidade para efectuar ensaios sensoriais ao produto e avaliar ou prever os efeitos de modificações nas matérias primas, receitas, processamento, armazenamento, envelhecimento. [40]

1.3.1.2 Tipo de testes

Para avaliar os parâmetros sensoriais utilizam-se diferentes tipos de testes, sendo cada um adequado a determinado tipo de ensaios, descrevem-se em seguida:

Testes analíticos: utilizados para controlo experimental e elevada precisão.

Testes discriminativos: são de execução dúples; necessários 20 a 40 provadores; volume mínimo de amostra líquida de 15 a 20ml e para amostras sólidas, 25 a 30g. [40]

Testes descritivos: é feita a quantificação das características sensoriais detectadas; técnica de análise muito informativa; aplicada na: caracterização de uma vasta gama de produtos, na detecção das suas alterações e no desenvolvimento de novos produtos. [40]

Testes afectivos: quantificam o gosto por um determinado produto; implicam a utilização de consumidores e condições de teste que coincidam com as condições habituais de prova pelos consumidores. [40]

1.3.2 Alterações sensoriais e nutricionais

Os vários tipos de tratamento aplicados podem apresentar implicações em vários aspectos sensoriais e nutricionais do leite alterando parâmetros como a cor e sabor, o perfil proteico e vitamínico.

Em seguida descrevem-se alguns tipos de tratamento aplicados e seus efeitos sobre o leite.

1.3.2.1 Efeitos do tratamento térmico

Os efeitos do tratamento térmico dependem de vários factores, nomeadamente, natureza do meio, duração e intensidade do próprio tratamento [41]. Estas alterações são descritas em seguida.

Cor e sabor:

O leite tem cor branca-amarelada e sabor difícil de definir, é assim que geralmente é descrita pelos painéis de degustação.

Numerosas substâncias, como glícidos, compostos carbonilo, ácidos gordos livres e aminas, contribuem para o sabor do leite; no entanto, nenhuma delas se encontra presente em concentração suficiente para que o seu sabor se sobreponha; o sabor ligeiramente adocicado do leite fresco é atribuído aos seus constituintes principais (proteínas, gorduras, lactose, cloretos) [42].

A cor e o sabor podem ser afectados nos leites processados por evaporação de água, pois a quantidade de nutrientes por unidade de peso é superior à do leite em natureza [43].

Dentro dos métodos de pasteurização, o método HTST modifica menos o sabor do que tratamentos térmicos com temperaturas superiores a 62°C durante, pelos menos, 30

minutos como o método de *Holder*. A fervura afecta mais o sabor do leite do que a pasteurização [43].

Com a esterilização há modificação do sabor do leite, nas provas sensoriais refere-se esse sabor como "gosto a cozido". Para esta alteração contribui a desnaturação das proteínas e a ocorrência de reacções de Maillard [42].

O leite UHT é comparável, em cor e sabor, a leite pasteurizado, apesar de ter um aspecto e sabor mais uniforme devido à homogeneização e ao tratamento térmico que afectam as propriedades da caseína [44].

Dos leites concentrados, o evaporado tem cor amarelada e o condensado apresenta cor branca-amarelada e sabor açucarado. A cor dos leites em pó é também branca-amarelada [45].

Proteínas:

A desnaturação das proteínas do leite pelo calor é um fenómeno relativamente comum. As proteínas do soro são as mais susceptíveis a esta modificação e podem ser desnaturadas pelo aquecimento acima de 65°C [41].

Em estudos da percentagem de desnaturação das proteínas em função do processamento, foram obtidos valores de: 51 a 68% para leites UHT, 30 a 36% para a pasteurização HTST, 20 a 30% para a baixa pasteurização (63°C durante 30 minutos) e 87% para a esterilização [41].

O aquecimento do leite, com o objectivo de evaporar água, contribui também para desnaturar as proteínas do soro. O significado nutricional destas alterações da estrutura proteica traduz-se por aumento da digestibilidade das proteínas desnaturadas [41].

Com tratamento térmico podem também ocorrer reacções de Maillard que podem dificultar a acção enzimática. Esta reacção indisponibiliza a lisina pela formação de complexos de Maillard com a lactose [41].

Nos leites UHT, o processamento térmico é de curta duração (inferior a 60 segundos) e a perda de aminoácidos, nomeadamente lisina, é negligenciável [41].

A intensidade da reacção de Maillard é mais marcada no leite esterilizado, e nos leites em pó ou UHT armazenados durante longos períodos de tempo a temperatura elevada [41].

A percentagem característica de lisina indisponível em função do processamento é no: leite pasteurizado de 1 a 2%, leite UHT de 2 a 4%, leite esterilizado de 6 a 10%, leites concentrados de 15% a 20%, leites em pó de 3 a 40% (3 a 10% no tratamento de *spray drying* e 5 a 40% no tratamento *drum drying*) [46].

Relativamente à redução do valor biológico das proteínas pelo processamento, referem-se valores de 6% para leites esterilizados e de 8% para leites em pó [46].

Outra das consequências do aquecimento das proteínas lácteas em meio aquoso, mesmo que moderado (a partir de 50°C), é a formação de um complexo lisino-alanina. Esta reacção depende de vários factores como estrutura da proteína, pH, duração e temperatura do tratamento térmico, [46] e diminui também a biodisponibilidade destes aminoácidos.

Vitaminas:

Relativamente à destruição vitamínica pelo processamento térmico industrial, as perdas referem-se geralmente às vitaminas B1, B6, B12 e ácido fólico. No entanto, a fervura e o processamento de leites em pó contribuem também para a destruição das vitaminas B2, E e biotina [47].

As modificações provocadas pela pasteurização são mínimas, podendo atingir 10% das vitaminas B1 e B12. A pasteurização apresenta os valores mais baixos de diminuição do teor vitamínico do leite, relativamente aos tratamentos de esterilização e UHT. As vitaminas lipossolúveis não são afectadas neste tipo de tratamento [47].

Nos leites UHT, o período de tempo de processamento térmico é curto, e resulta apenas numa redução mínima do valor nutricional; contudo, as perdas vitamínicas podem aumentar ao longo do período de conservação, não se evitando que ao fim de algumas semanas sejam maiores. Passados 3 meses, o leite UHT regista uma diminuição do teor de várias vitaminas [47].

Em relação aos leites concentrados, as perdas vitamínicas são inferiores no leite condensado, no entanto são ainda menores no leite em pó [48].

Associado aos tratamentos térmicos há outro factor a ter em consideração, o tipo de embalagem utilizada na conservação dos leites, nomeadamente para o UHT. A utilização da embalagem Tetra Pak para o acondicionamento do leite, evita a penetração do ar e da luz diminuindo os riscos de alteração da qualidade e sabor do alimento. Tal objectivo é possível uma vez que estas embalagens são compostas por vários materiais, desde alumínio, cartão a plástico [48].

1.3.2.2 Efeitos da sonicação

Os tratamentos por sonicação têm como consequências turbidez e temperaturas elevadas, caso não se controle os tempos e a temperatura de processamento.

Pela turbidez provocada a potências de 60w com tempos de 30s, 60s e 120s, ocorre a alteração de compostos fenólicos e a lise celular de alguns microrganismos [37,49].

O facto de se atingir temperaturas elevadas, pode provocar alteração em ácidos gordos polinsaturados, açúcares e proteínas, mais sensíveis ao calor, sendo que também pode ocorrer alguma degradação de vitaminas termolábeis [37,49].

No entanto o problema em relação à degradação dos ácidos gordos polinsaturados não se coloca directamente nos ultra-sons, mas sim na temperatura atingida, tal como acontece também na aplicação por microondas.

1.3.2.3 Efeitos do tratamento térmico combinado com ultra-sons

As alterações a nível físico-químico e nutricional (proteína e gordura), são minimizadas, combinando o tratamento térmico com ultra-sons, no caso do leite pasteurizado [37].

Em relação à cor o tratamento térmico combinado com ultra-sons mantém o leite branco, mostrando melhores parâmetros de cor e homogenização por um período de 14 dias, comparado com leite tratado termicamente e leite cru [37, 49].

No leite ultrasonificado pode encontrar-se maior quantidade de gordura, cerca de mais 4%. Tal facto pode ser explicado devido às gotas de gordura romperem devido à acção dos ultra-sons, melhorando a disponibilidade da gordura [37, 49]. Os valores de pH permanecem constantes por mais de 14 dias [49].

A proteína no leite tratado com a combinação da temperatura e ultra-sons encontra-se em níveis mais baixos do que no leite cru, no entanto os níveis de proteína no leite tratado com ultra-sons são os mesmo que o leite cru [37], o que permite concluir que é o tratamento térmico que reduz os níveis proteicos e possivelmente o valor biológico das proteínas.

1.3.3 Determinação do valor nutricional do leite

Após sujeitar o leite a determinado tipo de tratamento é importante avaliar as alterações que este possa ter sofrido realizando-se uma avaliação completa do valor nutricional do leite. Para tal podem determinar-se vários parâmetros que se descrevem em seguida.

Matéria Gorda, método Gerber NP 469-1988: efectua-se a libertação de toda a matéria gorda por dissolução das substâncias proteicas, seguindo a separação da matéria gorda por centrifugação e posterior medida volumétrica. Aplica-se a leite natural e UHT [50].

Matéria Gorda: Gravimetricamente por extracção da gordura através de uma solução alcoólica ou em amónia mediante éter etílico e éter de petróleo, após evaporação dos solventes pesa-se o resíduo (seguindo o princípio do método Rose-Gottlieb). Aplica-se a leite em pó e desnatado [50].

Proteína: Determinação do azoto total (método Kjeldahl): tratamento do leite com ácido sulfúrico em presença de óxido mercúrio II, como catalizador com a função de transformar o azoto dos compostos orgânicos em azoto amoniacal. O amoníaco liberta-se por adição de hidróxido de sódio, destila-se e mistura-se a uma solução de ácido bórico [50].

Pode-se também determinar o conteúdo em determinada proteína de interesse utilizando diferentes técnicas como HPLC, MS ou electroforese, como no caso deste estudo com a β -LG.

Matéria seca: diluição em água e secagem a temperatura constante. O peso obtido depois de secar representa a matéria seca.

Cinzas: incineração da matéria seca, seguida de uma leve corrente de ar. O conteúdo em cinzas é expresso em % de peso.

Cálcio: dissolução do cálcio após precipitação das proteínas com ácido tricloroacético. O cálcio contido no filtrado é precipitado em forma de oxalato de cálcio, que se separa por centrifugação [50].

Fósforo: depois de eliminar a matéria orgânica do leite por incineração determina-se o teor de fósforo colorimetricamente, através da redução do amónio fosfomolibdato com diamonifenol (amidol) e mede-se a densidade óptica da solução obtida [50].

Acidez: expressa em massa de ácido láctico por 100g de leite. Diluição do leite em água com adição de uma solução de fenolftaleína (como indicador). Determina-se igualando a cor com outra quantidade igual de leite em pó diluída e misturada com acetado de rosanilina [50].

Índice de solubilidade: quantidade de sedimento expressa em volume.

Podem ainda determinar-se uma série de outros parâmetros como: os açúcares totais por determinação enzimática [51]; lactose por espectrometria por absorção no infravermelho

[52]; vitaminas A, E e C por HPLC; vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 e B12 por ensaios microbiológicos por turbidimetria; Colesterol por cromatografia em camada fina e em fase gasosa; densidade por ensaios volumétricos [51].

1. 4. Técnicas de avaliação de amostras proteicas

Quando abordamos a questão da melhor metodologia no tratamento de amostras de proteínas, entramos necessariamente no campo da proteómica. Termo usado para designar a abordagem experimental na identificação global das proteínas de amostras complexas, nomeadamente de organismos inteiros como bactérias [53].

Sem dúvida que estes avanços tecnológicos estão a dar um contributo importante na investigação em várias áreas, desde a medicina no diagnóstico e controlo de doenças, à defesa militar, no controlo do bioterrorismo, permitindo por exemplo a identificação rápida de bactérias [2].

Na medicina o estudo da relação entre proteínas e o transporte intracelular pode permitir novas terapias em doenças degenerativas como a fibrose cística, Alzheimer, leucemia, hipercolesterolemia familiar, diabetes [54].

O sucesso na obtenção de resultados em proteómica baseia-se fundamentalmente nas técnicas de separação utilizadas, principalmente electroforese 2D e HPLC, e na instrumentação de Espectrometria de Massa (MS). Outros suportes fundamentais da proteómica são as bases de dados de sequenciação de proteínas, e as ferramentas bioinformáticas [53].

1.4.1 Electroforese

As técnicas de electroforese em gel mais comuns são a electroforese bidimensional e unidimensional.

A primeira permite a separação de proteínas numa primeira dimensão de acordo com o seu ponto isoeléctrico e numa segunda dimensão de acordo com o seu peso molecular, a unidimensional permite a separação de proteínas apenas em função do peso molecular (desnaturante com SDS) ou relação carga/massa (nativa) [55]. Um exemplo de um equipamento de electroforese para a primeira dimensão, encontra-se na figura 1.3.

A electroforese bidimensional permite separar e identificar proteínas de amostras mais complexas, como extractos celulares. A técnica bioquímica que presentemente oferece melhor

capacidade de resolução dos componentes de misturas complexas de proteínas é a electroforese bidimensional.



Figura 1.3 – Sistema completo de electroforese Mini-Protean Tetra da Bio-Rad

São também utilizadas outras técnicas como a cromatografia líquida ou a electroforese capilar acoplada à detecção por espectrometria de massa [56].

Os procedimentos da electroforese bidimensional consistem essencialmente na separação das proteínas numa primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoeléctrico e numa segunda dimensão com base no tamanho molecular, resultando um mapa característico de manchas, cada qual correspondendo a um único tipo de proteína. Na prática corresponde a efectuar consecutivamente uma focagem isoeléctrica e uma electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Poderão ser separadas milhares de proteínas em simultâneo, das quais se pode obter informação sobre o ponto isoeléctrico e peso molecular [56].

A detecção das manchas num gel bidimensional poderá ser realizada no próprio gel, sendo a visualização feita por coloração com Azul de *Coomassie* ou com Nitrato de Prata. Existe outra alternativa de coloração com moléculas fluorescentes como o laranja e vermelho SYPRO, que combina as vantagens dos dois métodos anteriores, por um lado tem um limite de detecção elevada como o Nitrato de Prata e é simples de executar como o *Coomassie Blue*. É compatível com as técnicas de análise de espectrometria de massa e de sequenciação de aminoácidos, mas também exige equipamento especial para visualização e registo de imagem com custos relativamente elevados [56].

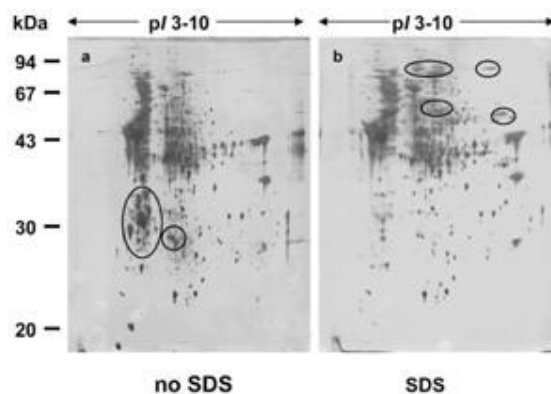


Figura 1.4. – Fotografias de exemplos de géis bi-dimensionais [57]

Quando a amostra de proteínas não é muito complexa normalmente a separação obtida com uma electroforese unidimensional é suficiente, como no caso da amostra estudada neste trabalho.

A etapa seguinte será a coloração de forma a ser possível a visualização dos péptidos obtidos permitindo posteriormente a sua identificação ou separação e digestão (digestão em gel).

A coloração com Azul de *Coomassie* é compatível com a maioria das proteínas e com os métodos mais comuns de identificação como a espectrometria de massa, no entanto apresenta algumas limitações, como a sensibilidade, não permitindo a visualização de proteínas em baixa concentração ou baixo peso molecular [2,58].

A coloração com nitrato de prata permite visualizar proteínas com peso molecular mais reduzido com maior nitidez, é no entanto um método mais complexo e demorado [58].

Após a separação e visualização da proteína em estudo, um método rápido de proceder à confirmação da sua identificação é extraí-la do gel, proceder à sua digestão e em seguida à detecção por MS.

Uma das vantagens da electroforese é a sua sensibilidade para detectar adulterações como a adição de leite de vaca em queijos de ovelha ou cabra, tendo aplicabilidade na indústria de lacticínios [52].

1.4.2 Digestão de proteínas separadas em gel

Nos procedimentos de digestão aplicados a proteínas previamente separadas por electroforese num gel deve-se ter em conta os seguintes parâmetros:

- Acessibilidade da enzima às ligações passíveis de serem clivadas. Pode estar comprometida pelo facto de a proteína se encontrar imobilizada no interior da estrutura do gel [2,53].
- Manter uma adequada relação enzima / substrato é de grande importância, podendo ser mesmo decisivo para os resultados obtidos.
- O solvente no interior do gel deve estar controlado de forma a obter um bom rendimento de digestão. Um dos procedimentos é desitrar os fragmentos de gel com acetonitrilo e secar em vácuo de forma a facilitar a entrada da enzima no interior do gel numa posterior fase de re-hidratação [2,53].
- Controlar o pH e temperatura da solução de digestão de forma a manter a eficácia da acção enzimática [53,58].

A digestão enzimática em gel, normalmente é efectuada por incubação a 30°C ou 37°C por períodos que podem variar até 18 horas [2, 58].

A mistura de péptidos obtida por digestão é acidificada de modo a interromper a acção enzimática [2,53].

Os procedimentos da digestão em gel apresentam alguns inconvenientes:

- A condição de imobilidade da proteína no interior do gel torna algumas ligações peptídicas inacessíveis à enzima [2,53].
- Alguns péptidos obtidos podem não ter a capacidade de se difundirem do interior do gel para a solução [2,53].

1.4.3 Digestão de proteínas em solução

A estrutura da proteína e as suas propriedades físicas e químicas são muito variáveis, assim o grau de digestão, a quantidade e o tipo de péptidos obtidos podem variar dependendo da proteína [2].

Quando se recorre a este procedimento é importante considerar:

- Proteínas de maior peso molecular são mais facilmente identificáveis
- Podem ocorrer variações no rendimento de digestão entre amostras.

Para superar estas limitações, as proteínas devem ser precipitadas com acetona e de seguida o precipitado deve ser dissolvido em tampão bicarbonato de amónio ou ureia, de modo a quebrar as ligações intra-moleculares e desnaturar a proteína [2,53].

De modo a prevenir a renaturação da proteína antes da acção enzimática será necessário reduzir e alquilar as pontes dissulfureto da proteína. Estes passos são efectuados com o recurso de DL-ditotreitól (DTT) e iodoacetamida (IAA) [2,31,53].

Para interromper a digestão enzimática recorre-se à adição de ácido trifluoroacético ou ácido fórmico [2,53].

1.4.4 Digestão de proteínas em coluna

Uma vez que a digestão enzimática efectuada em gel ou em solução pode apresentar algumas desvantagens:

- Longos tempos de digestão (até 12 horas);
- Racio proteína/enzima, geralmente baixo, obtendo baixos rendimentos de digestão;
- Quando a concentração de substrato é baixa, a digestão apresenta-se com baixo rendimento;
- Procedimentos demorados e trabalhosos, com risco de perda de péptidos por adsorção [2].

De forma a minimizar estas desvantagens, a digestão pode ser feita em suportes sólidos com a enzima imobilizada. As vantagens destes procedimentos são a nível dos tempos de digestão, mais curtos, rendimentos de digestão mais elevados e permite o acoplamento com sistemas de separação multi-dimensional para tratamento da amostra e análise on-line [2,53].

Consegue-se trabalhar com colunas de elevada densidade de enzima imobilizada, o que facilita a inclusão em sistemas integrados com detecção MS para identificação de péptidos [2].

Mas como nem tudo é perfeito, apresenta também algumas desvantagens, a começar pelo elevado custo e reduzida actividade catalítica [2].

Nesta metodologia a cromatografia multi-dimensional é usada para purificar as misturas proteicas, as proteínas separadas passam para o interior da coluna onde se encontra a enzima imobilizada e os péptidos formados são separados por HPLC de fase reversa [2].

1.4.5 Identificação das proteínas

Para identificar uma proteína após a sua separação e purificação utilizam-se técnicas que permitem uma identificação mais correcta do que a obtida com a electroforese por exemplo. Assim, depois da digestão enzimática é possível analisar a mistura de péptidos obtidos por técnicas como a espectrometria de massa [2,31] ou uma identificação recorrendo a anticorpos.

1.4.5.1 Identificação por Peptide Mass Fingerprint

Neste trabalho experimental a técnica escolhida foi a desorção de iões induzida por laser – MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry).

Depois de se ter determinado a massa experimental, dos vários péptidos resultantes da digestão enzimática, compara-se com a massa teórica numa base de dados de proteínas sequenciadas (Peptide Mass Fingerprint) [4,31,59].

Logicamente temos uma limitação neste passo, uma vez que caso a proteína a identificar não faça parte desta base de dados, a identificação da proteína torna-se impossível [2].

A pesquisa numa base de dados resulta num conjunto de parâmetros e resultados estatísticos que indicam a identificação positiva ou negativa da proteína [2]. Esses parâmetros são: pontuação Mascot; sequência de cobertura da proteína; número de péptidos identificados.

Obtem-se uma probabilidade superior a 95% na região da pontuação Mascot na qual a identificação corresponde a um falso positivo. Um resultado fora dessa zona tem uma probabilidade superior a 95% de ser um verdadeiro positivo [60].

A sequência de cobertura da proteína representa uma medida da correspondência existente entre a sequência da proteína na base de dados e a sequência de péptidos obtida experimentalmente [2,60].

O conceito de número de péptidos identificados é o mais intuitivo, uma vez que este indica quantos péptidos, do conjunto de massas obtido experimentalmente correspondem a péptidos da proteína identificada [2,60].

Na figura 1.5 apresentam-se espectros de MALDI-TOF para duas proteínas intactas.

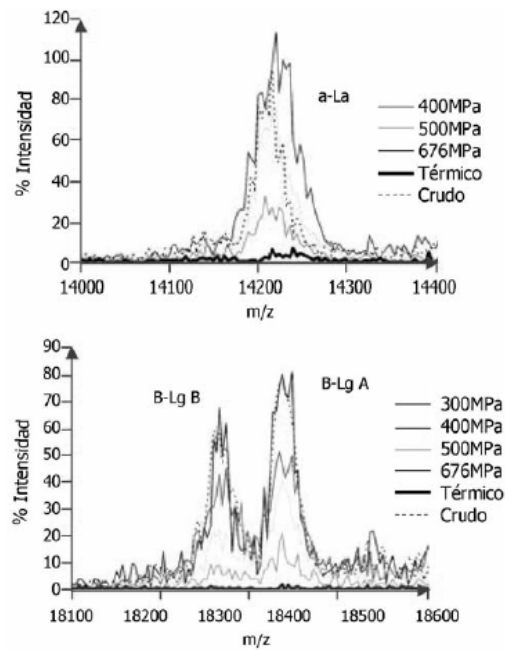


Figura 1.5. – Espectros da α -LA e β -LG obtidos por MALDI-TOF-MS [61]

1.4.5.2 Identificação por anti-corpos

Numa mistura complexa de proteínas o método mais rápido na identificação recorre a anti-corpos para uma dada proteína uma vez que deste modo são dispensáveis todos os procedimentos de tratamento e purificação da proteína.

É um método de início um pouco moroso devido ao tempo necessário para o crescimento dos anti-corpos, mas que depois pode poupar muito tempo, no entanto são métodos de elevados custos em laboratório o que pode inviabilizar a sua selecção. Dentro deste tipo de métodos temos a imunoprecipitação, o imunoblotting, a imunofluorescência ou ELISA, utilizado por exemplo para detectar adulterações no leite [52].

Os exames laboratoriais para o diagnóstico de alergia ao leite de vaca são um exemplo da aplicação deste método pela pesquisa de anticorpos da classe IgE no sangue (RAST) e na pele (teste cutâneo), entre outros tipos de análises efectuadas tais como a biópsia gástrica, biópsia intestinal, teste de contacto (patch teste), sangue oculto fecal, pesquisa de perda de proteína pelas fezes (alfa 1 antitripsina fecal) [62].

1. 5. Objectivos

A aplicação dos ultra-sons para acelerar a digestão enzimática já foi conseguida em trabalhos anteriores, podendo ser aplicada nas mais diversas áreas, e com outras proteínas como a α -lactoalbumina. Os objectivos desses estudos eram testar o procedimento de digestão enzimática acelerada de proteínas com diversos equipamentos de ultra-sons, variando tempos e frequências de sonicação com o objectivo de aplicar este tipo de tratamentos ao leite para a diminuição da sua alergenicidade [2, 3,4].

A tripsina foi a enzima seleccionada para este estudo uma vez que apresenta bom desempenho no aumento da digestibilidade e diminuição da alergenicidade das proteínas do soro do leite de vaca.

Neste trabalho propõe-se testar e otimizar a hidrólise enzimática da β -lactoglobulina existente no leite, por acção da tripsina, com aceleração por meio de ultra-sons com o recurso a um método não invasivo, testando vários equipamentos de sonicação. Assim, pretende-se ainda avaliar o grau de hidrólise obtido e as implicações do tratamento aplicado no produto original, o leite utilizado para consumo. Como essas alterações têm consequências a nível organoléptico realizou-se uma prova de degustação do leite sem tratamento enzimático e com tratamento enzimático, analisando-se os vários parâmetros organolépticos.

Como objectivo final pretende-se que as condições testadas sejam passíveis de aplicação em “scale up” para utilização na indústria de lacticínios. Com base neste estudo poder-se-ia idealizar um equipamento que permitisse trabalhar com grandes volumes mas sem problemas quanto à distribuição homogénea dos ultra-sons e sem a invasão de materiais no produto. Um aparelho em túnel poderia corresponder a esses objectivos.

2 – Materiais e Procedimento Experimental

2. Materiais e Procedimento Experimental

Como material de estudo foi seleccionado o leite em pó magro, uma vez que não apresenta teor elevado de matéria gorda que pode interferir na análise.

Testou-se também um leite utilizado para alimentação infantil, o leite Aptamil Júnior, para analisar as possíveis variações entre diferentes tipos de leites e observar a presença da β -LG, que foi a proteína escolhida para o estudo neste trabalho. No entanto nos primeiros ensaios com o VialTweeter utilizou-se a α -LA, uma vez que para esta proteína, já existiam resultados de estudos de aceleração da digestão enzimática por ultra-sons, permitindo assim comparar os resultados.

2. 1. Amostras testadas

O trabalho experimental foi efectuado utilizando como amostras de leite para tratamento os seguintes leites em pó: leite de vaca magro em pó “Molico” da Nestlé e leite de vaca em pó “Aptamil Júnior” da Milupa

Em seguida apresenta-se uma tabela com a descrição da análise nutricional dos leites utilizados.

Tabela 2.1. – Análise nutricional dos leites “Molico” da Nestlé e do leite “Aptamil Júnior” da Milupa

Parâmetros e Nutrientes	Valores por 100g	
	Leite vaca magro em pó Molico	Leite em pó Aptamil Jr
Valor calórico (Kcal)	373Kcal	67Kcal
Proteínas	36,8g	1,5g
Glícidos	54,1g	8,5g
Lípidos	1g	3g
Fibra (oligossacáridos)	0	1,2g
Ca	1550mg	85mg
P	1079mg	46mg
Na	Não mencionado	25mg
K	Não mencionado	78mg
Vit. B2	1,98mg	0,111mg
Vit. B12	2,6 μ g	0,18 μ g
Carga Soluta Renal (potencial)	Não mencionado	143 mOsmol/l

2. 2. Sistemas de sonicação

Nos ensaios realizados neste trabalho utilizaram-se diferentes tipos de equipamento de sonicação que se descrevem de seguida.

2.2.1 Ultra-sonicador, modelo Vial Tweeter UIS250V

Este modelo é equipado com um processador de ultra-sons UIS250v, que debita 250watts de potência máxima e uma frequência de sonicação de 24kHz, podendo observar uma imagem deste na figura 2.1. [32].

Consegue-se obter 10 watts em cada poço, dos 6 localizados na zona com maior intensidade de potência e 5 watts dos 2 poços localizados na zona mais afastada, com menor intensidade de potência [32].

O facto de colocar o tubo directamente em cada poço, tem a vantagem de diminuir a perda de energia dos ultra-sons dispersa na água [32].

Testou-se o efeito da sonicação com tipos de tubos diferentes nos vários poços do ultrasonicador, para confirmar as possíveis diferenças na intensidade dos ultra-sons já referidas pelo fabricante. Deste modo seria possível definir os poços deste equipamento com maior intensidade de sonicação, obtendo-se uma hidrólise enzimática mais eficiente. Assim testou-se amostras iguais em diferentes posições (A a H), tal como se pode encontrar na tabela 3.2 e 3.3. Sendo as posições G e H as mais afastadas, seguidas das posições E, F, C, D, A e B.

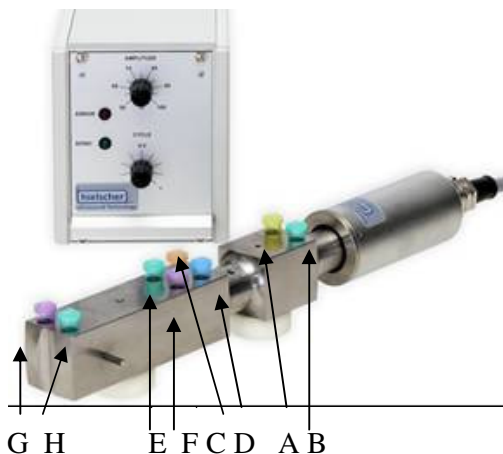


Figura 2.1 – Ultrasonicador, modelo Vial Tweeter UIS250V [32]

2.2.2 Sonoreactor, modelo UTR200

O sonoreactor fornece sonicação indirecta e pode ser considerado como um banho de ultra-sons de alta intensidade, no qual as amostras podem ser tratadas em recipientes fechados evitando assim a formação de aerossóis e contaminações entre as amostras. Pode ser observada uma fotografia deste equipamento na figura 2.2. [2,32].

Com uma potência de 200 watts pode operar a uma frequência de 24 kHz [33].

A intensidade de sonicação pode chegar a ser cerca de 50x superior à obtida com banho de ultra-sons e cerca de 30x menos intensa que a obtida com a sonda [2,32].



Figura 2.2 – Sonoreactor, modelo UTR200 [32]

2.2.3 Sonda de ultras-sons, modelo UP50H

Com uma potência de 50 watts pode operar a uma frequência de 30 kHz e pode apresentar um diâmetro de 0,5mm a 7mm, para volumes de amostras de 10 μ L a 250L [32].

A sonda utilizada no trabalho experimental foi a de 0,5mm de diâmetro, uma vez que o volume das amostras utilizadas era de 50 μ L.

As aplicações deste aparelho podem passar pela ruptura de tecidos ou bactérias, ou homogenização de amostras na indústria alimentar [32].



Figura 2.3 – Ultrasonicador, modelo UP50H [32]

2.2.4 Banho de ultra-sons, modelo Transsonic TI-H5, da Elma.

Este sistema permite obter uma sonicação indirecta, sendo composto pelos mais recentes avanços tecnológicos relativamente a banhos de ultra-sons [2].

Encontramos neste aparelho duas frequências de ultra-sons reguláveis, 35 ou 130kHz, permite escolher ainda uma amplitude de sonicação entre 10 a 100% [33].

Funciona com três opções: 1ª Standart: multi-frequências; 2ª Sweep: otimiza a distribuição dos ultra-sons; 3ª Degas: para um rápido e eficaz desgasificação de líquidos. Possui também controlador de temperaturas e de tempo [33].

A zona onde se regista maior intensidade é no centro do banho de ultra-sons [2].



Figura 2.4 – Banho de ultra-sons [33]

2. 3. Parâmetros instrumentais utilizados em MALDI-TOF-MS

O sistema MALDI-TOF-MS, utilizado para obter os espectros, foi o modelo *Voyager DE-PRO* Biospectrometry Workstation equipado com laser de azoto (337nm) da Applied Biosystems (Foster City, USA) [2,61].

Os espectros de MALDI foram adquiridos de acordo com as indicações do fabricante e processados pelo programa informático *Data Explorer* versão 4.

A matriz utilizada na análise de MALDI-TOF-MS foi preparada por dissolução de 10mg de Ácido alfa-cyano-4-hidroxycinnamico (α -CHCA) da Fluka em 1ml de água Mili-Q + 1ml de acetronitrilo (PA Panreac) + 2 μ L de TFA - ácido trifluoroacetico (Riedel-De Hæn 61030).

A análise por MALDI-TOF-MS é efectuada após a mistura de 2 μ L de amostra com 2 μ L de matriz α -CHCA.

Para analisar a amostra no MALDI-TOF-MS, usou-se uma placa de aço galvanizado e aplicou-se directamente 1 μ L da mistura anterior numa dada posição. Depois de secar em vácuo até a cristalização da amostra, colocou-se a placa no MALDI-TOF-MS e realizaram-se as medições.

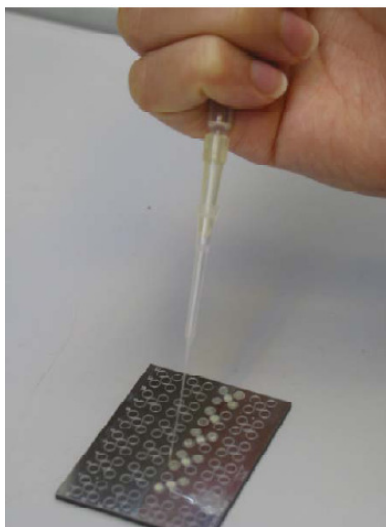


Figura 2.5 – Fotografia da aplicação da amostra na placa de Maldi [60]

As condições das medições foram as seguintes: modo reflector positivo; accelerating voltage de 20 kV; grid voltage de 75,1%; guide wire de 0,002%; delay time de 80ns.

Antes das medições das amostras foram realizadas duas calibrações externas próximas com os picos isotópicos dos seguintes péptidos e respectivas massas/carga (m/z): Bradykinin (757,39); Angiotensina II (1046,54); P14R (1533,86); ACTH (2465,19). A calibração de massas foi efectuada com ProteoMass Peptide MALDI-MS Calibration kit (MSCAL2) da Sigma.

O espectro obtido para cada amostra resulta da média de 500 disparos de laser.

A pesquisa e identificação das proteínas foram efectuadas no motor de busca “MASCOT” (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). Foram estabelecidos os seguintes parâmetros na pesquisa:

- Database: SwissProt.
- Molecular weight (MW) of protein: all
- Missed cleavage: two
- Fixed modifications: carboamidomethylation
- Variable modifications: oxidation (M)
- Peptide tolerance até 150ppm.

A identificação foi considerada positiva quando a pontuação (score) de identificação da proteína se encontrava fora da zona do erro estatístico.

Podemos definir Score como a probabilidade de 95% de identificação da proteína.

O sequence coverage ou sequência de cobertura é a medida em percentagem que representa a cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos obtidos experimentalmente.

2. 4. Electroforese SDS-PAGE

Realizaram-se ensaios de electroforese SDS-PAGE com geis de poliacrilamida 12,5% Tris-glicina e posteriormente em gel de poliacrilamida 15 e 20% Tris-Tricina [63].

Esta última escolha justifica-se uma vez que permite uma separação proteínas de menor massa molecular, entre 1 a 100 kDa com maior resolução, que estaria na gama de massas esperadas pelo tamanho dos peptídeos obtidos pela hidrólise da β -LG.

Foram usados os seguintes padrões de massa molecular: GE HealthCare 17-0446-01 nos geis Glicina; Polypeptide SDS-PAGE nos geis Tris-Tricina.

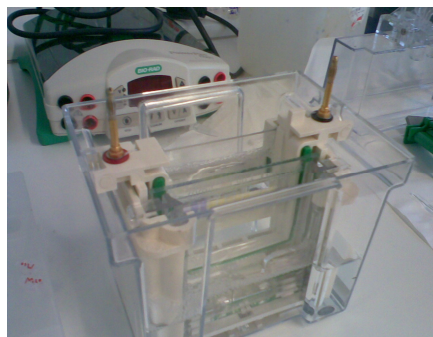


Figura 2.6 – Tina e cassete de electroforese utilizados

As proteínas foram visualizadas após coloração usando corante Azul de *Coomassie* [63], sendo de seguida fotografadas com o aparelho Kodak Gel Logic 1000, cuja imagem se encontra na figura 2.7.



Figura 2.7 - Kodak Gel Logic 1000 [64]

2. 5. Procedimento de digestão enzimática acelerada de proteínas

Procederam-se a vários ensaios de degradação da β -LG (Sigma L0130) e do leite por hidrólise enzimática utilizando a tripsina da Sigma ref. T6567 e da Fluka Cat. 93610, para verificar a eficácia desta, com e sem tratamento prévio e aplicação de ultra-sons.

A tripsina da Sigma foi utilizada na digestão da amostra para análise por MALDI-TOF-MS, uma vez que se trata de uma tripsina mais pura, logo a mais indicada para um equipamento de elevada precisão e uma análise tão sensível.

A tripsina da Fluka foi utilizada na análise por electroforese em gel SDS-PAGE.

Testaram-se vários equipamentos de sonicação de forma a avaliar a sua eficácia e aplicabilidade na digestão da β -LG.

Para confirmar a existência de hidrólise da β -LG do leite utilizou-se nos primeiros ensaios a análise por MALDI-TOF-MS e posteriormente a análise por electroforese SDS-PAGE.

2.5.1 Digestão enzimática acelerada de proteínas com ultrasonicador Tweeter

Tal como referido no ponto 2 nestes primeiros ensaios testou-se a digestão enzimática da proteína α -LA (Sigma-Aldrich ref. L6010) utilizando a tripsina, juntamente com a aplicação de ultra-sons, através do sonoreactor, modelo Vial Tweeter UIS250V. Realizaram-se ensaios a amplitudes de 50% e 90% com uma frequência de 30kHz, durante 8 minutos, com uma paragem de 60 segundos aos 4 minutos para evitar o sobreaquecimento da amostra.

A uma solução de 200 μ L com diferentes concentrações de α -LA adicionou-se 1 μ L de diferentes concentrações de solução de tripsina em TFA 0,01%, de forma a manter a proporção proteína:enzima na razão de 20 para 1, de acordo com resultados obtidos em estudos anteriores [2].

Para preparar a amostra de proteína para a digestão procedeu-se inicialmente ao seguinte tratamento:

1º Re-suspensão de 4 μ g de α -LA em 20 μ L de Ureia 6,5M

2º Redução da proteína com adição de 2 μ L de DL-dithiothreitol (DTT 99% da Sigma D0632) 110 mM em Bicarbonato de amónio (Ambic 99,5% da Fluka 09830), com 5 minutos de sonicação a 50% de amplitude com o modelo UTR200;

3º Alquilação da proteína com adição de 2 μ L de Iodoacetamida (IAA da Sigma I6125) 600mM em Ambic 12,5mM, com 5 minutos de sonicação a 50% de amplitude com o modelo UTR200;

4º Diluição com 72 μ L de Ambic 12,5mM

Procedeu-se então à digestão:

5º Adição de 1 μ L de Tripsina (diferentes concentrações) a 200 μ L com diferentes concentrações de amostras de proteína.

6º Aplicação de sonicação com modelo VialTweeter

7º Adição de 10 μ L de ácido fórmico 50%, para interromper a digestão enzimática

8º Processo de dessalinização com colunas ZipTip

9º Mistura de 2 μ L de solução matriz α -CHCA + 2 μ L amostra

10º Aplicação de 1 μ L na placa de MALDI

11º Obtenção dos espectros em MALDI-TOF-MS

12º Identificação dos péptidos na base de dados Mascot Massfingerprint

Na preparação da amostra para leitura em MALDI-TOF-MS para identificação dos péptidos obtidos, realizou-se a dessalinização com mini-colunas “ZIP-TIP” da Millipore nos primeiros ensaios da digestão e posteriormente com colunas de dessalinização montadas no laboratório. Desta forma são retiradas as interferências da ureia e dos sais dissolvidos na amostra, numa leitura tão sensível como a do MALDI-TOF-MS.

2.5.2 Digestão enzimática acelerada de proteínas com sonoreactor UTR200

Nos primeiros ensaios procedeu-se ao tratamento da proteína β -LG e do leite com os passos de redução e alquilação tal como referido em 2.5.1.

O aceleração da digestão enzimática foi efectuado com aplicação de ultra-sons com o sonoreactor modelo UTR200 a 50% de amplitude e testando vários tempos: 30 e 60 segundos, 2,5 e 5 minutos, num primeiro ensaio e posteriormente tempos de: 5, 10 e 20 minutos.

Foram realizados ensaios como brancos com o sonoreactor sem adição de enzima e adicionando tripsina (Fluka Cat. 93610) com um período de incubação de 20 minutos sem aplicação de ultra-sons.

No fim da digestão enzimática adicionou-se 1 μ L de ácido fórmico 99,5% (PA Panreac) de forma a interromper a acção da tripsina, mas apenas nos primeiros ensaios, uma vez que se observou que o ácido fórmico interferia na electroforese. Nos seguintes ensaios procedeu-se à inactivação da enzima por aquecimento, fervendo a amostra com adição de tampão de amostra.

Em seguida procedeu-se à aplicação das amostras num gel de Poliacrilamida SDS-PAGE.

Como o objectivo final do trabalho era obter um hidrolizado proteico sem adição de compostos químicos, para que este possa ser usado pela indústria alimentar para consumo humano, após se ter verificado que se conseguia a hidrólise da β -LG no leite, deixou-se de efectuar o tratamento da proteína nos ensaios posteriores. Desta forma eliminaram-se também possíveis interferências dos compostos adicionados na electroforese.

Posteriormente e depois de analisar as melhores condições de tratamento com os resultados obtidos por análise do gel de electroforese, com a β -LG comercial, passou-se a

utilizar também o leite para comparar com a proteína isolada, uma vez que o objectivo era aplicar as melhores condições de digestão ao leite de vaca.

O procedimento na preparação da amostra sem tratamento foi o seguinte:

1º Pré-aquecimento a 82°C durante 4 minutos

2º Adição de 1µL (1,75µg) de Tripsina em 35µL de β-LG e 1µL (0,5µg) de Tripsina em 10µg de leite

3º Aceleração por ultra-sons da digestão enzimática da β-LG durante 30 e 60 segundos e do leite durante 5, 10 e 20 minutos

4º Adição de 5µL de sample Buffer para interromper a digestão

5º Aquecimento a 82°C durante 4 minutos

6º Electroforese a corrente constante de 60mA durante 30 minutos

Testou-se também o método clássico de digestão com incubação de enzima “overnight” de forma a comparar a digestão por este método com o método acelerado de digestão de proteínas.

2.5.3 Digestão enzimática acelerada de proteínas com sonda de ultra-sons

A digestão enzimática da proteína β-LG e do leite magro foi realizada com a tripsina, juntamente com a aplicação de ultra-sons para acelerar a acção da tripsina, através da sonda de ultra-sons, modelo UP50H, com um diâmetro de 0,5mm. O aparelho funcionou com uma amplitude de 60%, obtendo-se uma frequência de 50 a 60 Hz, durante vários tempos testados (2, 4 e 6 minutos). Para os tempos superiores a 4 minutos foi realizada uma pausa de 30 segundos para evitar o sobreaquecimento.

Foram realizados ensaios como brancos com a duração de 6 minutos, com a sonda sem adição de enzima e adicionando tripsina sem aplicação de ultra-sons.

Foi realizado um ensaio como branco apenas com a sonda e com a tripsina durante 6 minutos. O volume de amostra utilizado foi de 50µL.

O procedimento na preparação da amostra sem tratamento prévio foi o seguinte:

- 1º Pré-aquecimento a 82°C durante 4 minutos
- 2º Adição de 1µL (1,75µg) de Tripsina em 35µL de β-LG e 1µL (0,5µg) de Tripsina em 10µg de leite
- 3º Aceleração por ultra-sons durante 2, 4 e 6 minutos
- 4º Adição de 5µL de sample Buffer para interromper a digestão
- 5º Aquecimento a 82°C durante 4 minutos
- 6º Aplicação das amostras num gel de electroforese a voltagem constante de 120V durante 70 minutos

2.5.4 Digestão enzimática acelerada com banho de ultra-sons

Para realizar a degustação do leite hidrolizado, seria necessário obter volumes maiores de amostras digeridas (cerca de 20ml por amostra por provador). Uma vez que os equipamentos de sonicação utilizados nos ensaios anteriores não eram adequados ao tratamento de volumes desta grandeza para tratar as amostras para degustação foi utilizado um banho de ultra-sons com o modelo Transsonic TI-H-5, tentando manter as condições definidas nos ensaios anteriores.

O procedimento na preparação da amostra sem tratamento prévio foi o seguinte:

- 1º Pesou-se 0,4g de leite em pó e dilui-se em 100ml de águaMQ
- 2º Repetiu-se o procedimento anterior de forma a obter um volume final de 400ml
- 3º Pré-aquecimento a 82°C durante 4 minutos
- 4º Adição de 1µL (1,75µg) de Tripsina em 10µg de leite
- 5º Banho de ultra-sons a 37°C com amplitude de 100% durante 30 minutos
- 6º Inactivação da Tripsina com aquecimento a 85°C durante 8 minutos

A amostra A foi obtida directamente pela diluição do leite magro em pó, sem qualquer tipo de tratamento, enquanto que a amostra B foi obtida depois de tratamento térmico e hidrólise enzimática.

3 – Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

Em seguida apresentam-se os resultados obtidos com os diferentes equipamentos de sonicação e as diferentes variáveis testadas.

3. 1. Tweeter

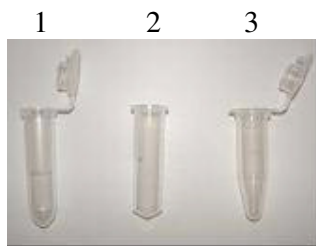
Seguem-se os resultados da análise por MALDI-TOF-MS das amostras de α -LA, após digestão enzimática acelerada com o ultrasonicador Tweeter, que se encontram na tabela 3.2 para uma amplitude sonicação de 50 % e tabela 3.3 para uma amplitude de 90% .

Nestes ensaios procurou-se avaliar as melhores condições de digestão da proteína, pela identificação dos péptidos resultantes utilizando a técnica de MALDI-TOF-MS. Assim determinaram-se para cada condição de digestão os parâmetros de score, percentagem de sequência de cobertura e número de péptidos identificados.

Nos ensaios realizados testaram-se diferentes tipos de tubos, tal como apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Legenda dos tipos de tubos utilizados para cada ensaio

1- Tubo longo oval
2- Tubo longo não oval sem tampa
3- Tubo pequeno oval "normal"



Em relação às posições G e H, não se apresentam resultados uma vez que não se obteve espectros, provavelmente por se tratar das posições com mais baixa intensidade de sonicação, tal como observado nos resultados obtidos com a amplitude de 90% (tabela 3.3).

Tabela 3.2 – Comparação dos resultados obtidos na digestão enzimática acelerada pelo Tweeter a 50% nos vários poços do ultrasonicador (A-H); (nd- não determinado); SD-desvio padrão

Digestão 8 min 50 % Amplitude - Tweeter										
posição	Tipo de tubo	score	média	SD	%Sequência de cobertura	média	SD	nº peptídeos identificados	média	SD
A	3	112			53			9		
		75	94	19	53	53	0	11	10	1
	1	72			53			9		
		71	72	1	53	53	0	7	8	1
	2	87			72			7		
		80	84	4	69	71	2	8	8	1
B	3	77			53			8		
		72	75	3	53	53	0	9	9	1
	1	116			53			10		
		70	93	23	53	53	0	8	9	1
	2	70			52			8		
		88	79	9	53	53	1	8	8	0
C	3	69			42			8		
		76	73	4	38	40	2	9	9	1
D	3	94			43			9		
		70	82	12	43	43	0	6	8	2
E	3	70			28			6		
		74	72	2	28	28	0	6	6	0
F	3	80			28			6		
		76	78	2	28	28	0	7	7	1
G	3	nd								
	1	nd								
H	3	nd								
	1	nd								

Tabela 3.3 – Comparação dos resultados obtidos na digestão enzimática acelerada pelo Tweeter a 90% nos vários poços do ultrasonicador (A-H)

Digestão 8 min 90 % Amplitude - Tweeter										
posição	Tipo de tubo	score	média	SD	%Sequência de cobertura	média	SD	%Sequência de cobertura	média	SD
A	2	82			43			9		
		83	83	1	53	48	5	8	9	1
B	2	85			43			8		
		85	85	0	53	48	5	9	9	1
C	2	133			53			9		
		87	110	23	43	48	5	7	8	1
D	2	85			43			9		
		107	96	11	53	48	5	8	9	1
E	2	97			53			9		
		70	84	14	28	41	13	6	8	2
F	2	79			53			10		
		83	81	2	43	48	5	8	9	1
G	2	84			53			9		
		93	89	5	53	53	0	10	10	1
H	2	79			53			9		
		71	75	4	53	53	0	8	9	1

Os melhores resultados obtidos verificam-se com uma amplitude de 90% a 8 minutos de sonicação, com uma pausa de 30 segundos, para evitar o sobreaquecimento da amostra.

Quanto às posições das amostras no Tweeter, as que apresentaram melhores resultados foram as posições A e B, sendo as posições com piores resultados E e H.

As posições A e B são as que se consegue obter maior intensidade de potência com o Tweeter, 10 watts em cada poço. As posições G e H a intensidade é mais baixa, ronda os 5 watts em cada poço [32].

Em relação aos tipos de tubos utilizados conseguiu-se melhores resultados com o tubo mais longo e com tampa. Tais resultados podem ser explicados pelo facto de conseguir-se uma maior superfície de contacto entre o tubo e as paredes do Vial Tweeter resultando numa melhor distribuição dos ultra-sons.

Para analisar os resultados o critério estabelecido foi o nº de péptidos identificados, o score e por fim a percentagem da sequência de cobertura.

Quanto aos resultados obtidos a amplitude de 50%, não se conseguiu obter espectros nas posições G e H e com as posições E e F obteve-se os piores resultados, sendo de novo as posições A e B as que permitiram obter os melhores resultados.

Na identificação das amostras com o recurso ao Mascot Peptide Mass Finger Print, apesar de se obter bons valores no score, sequência de cobertura e número de péptidos identificados, apenas se conseguiu identificação com dois “missed cleavage”. Mesmo depois de experimentar um volume superior, de 300 µl, os resultados não melhoraram. A tripsina não conseguiu obter uma digestão completa falhando dois locais de hidrólise.

Pelo facto de não se atingir os resultados desejados com o Tweeter na α -LA não se testou a β -LG, optando-se por testar outros aparelhos de sonicação.

No entanto testou-se também o Tweeter para a digestão do leite e posterior análise por electroforese.

O procedimento na preparação da amostra do leite foi o mesmo que o efectuado para a α -LA, mudando apenas os tempos de sonicação que no caso do leite foi de 20 minutos, depois da análise das bandas obtidas por electroforese, conclui-se que não se consegue obter uma hidrólise significativa da β -LG presente no leite.

3. 2. SonoreactorUTR200

Após efectuar o tratamento das amostras de β -LG e de leite, referido no ponto 2.5.2, aplicou-se uma alíquota de 5 μ L desta num gel de poli-acrilamida SDS-PAGE Glicina 12,5% corrido a uma voltagem constante 140V. O padrão utilizado contem as proteínas descritas na tabela 3.4.

Tabela 3.4. – Massas relativas do padrão de proteína: Low Molecular Weigh 17466.1 da GE

Mr (kDa)	Proteína
97	Glicogénio fosforilase (GF)
66	Albumina (BSA)
45	Ovalbumina (OV)
30	Anidrase Carbónica (AC)
20.1	Inibidor de Tripsina (IT)
14.4	α - LA (ALA)

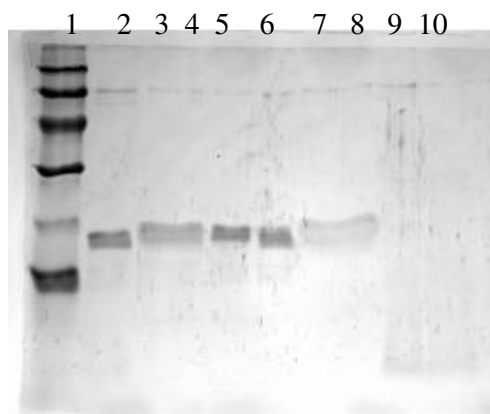


Figura 3.1 – Fotografia de gel poli-acrilamida SDS-PAGE 12,5% Glicina. Identificação dos poços: 1- Padrão; 2- β -LG; 3,4- β -LG com tratamento e sem digestão; 5,6- β -LG com tratamento + SR 30s sem tripsina; 7,8- β -LG com tratamento + digestão enzimática + SR 30s; 9,10- β -LG com tratamento + digestão enzimática + SR 60s

Após analisar o gel da figura 3.1. confirma-se que a massa da β -LG (18.4 kDa) encontra-se entre a banda de 14.4 e 20.1 kDa do padrão.

Testou-se a β -LG com tratamento, conseguindo-se bons resultados com a acção da tripsina e ultra-sons durante 60 segundos, ou seja uma hidrólise completa, tal como se pode observar nos poços 9 e 10 da figura 3.1.

Após efectuar o tratamento das amostras do leite referido no ponto 2.5.2, aplicou-se uma alíquota de 5 μ L desta num gel poli-acrilamida SDS-PAGE Tris-Tricina 20%.

Foi feito o cálculo para a quantidade de tripsina a usar na digestão com base no acerto que se fez da quantidade de leite pesado e da quantidade de proteína presente no leite, estando o valor de proteína por 100g de leite expresso na tabela 2.1.

Para ter a noção da quantidade de β -LG presente no leite a que correspondia a banda do gel observada, usou-se como referência o valor de 20% da proteína total do leite.

Tabela 3.5 – Massas relativas do padrão de Proteína: Polypeptide da Biorad

Mr (kDa)	Proteína
26.6	Isomerase triosefosfato (IT)
16.9	Mioglobina (M)
14.4	α -LA (ALA)
6.5	Aprotinina (A)
3.4	Insulina B, oxidada (I)
1.4	Bacitracina (B)

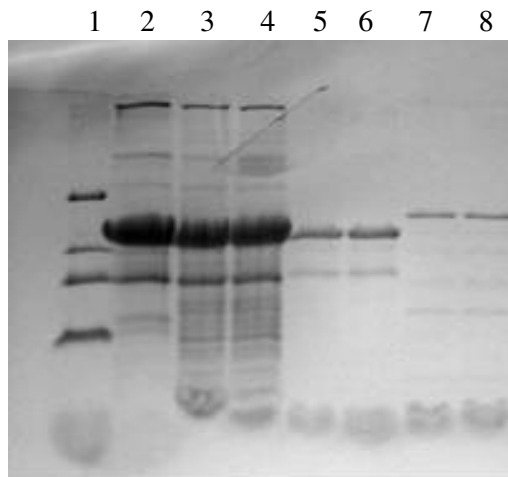


Figura 3.2 –Fotografia de gel poli-acrilamida SDS-PAGE Tris-Tricina 10 e 15%. Identificação dos poços: 1- Padrão; 2- β -LG; 3 e 4- β -LG sem tratamento + tripsina 60s; 5 e 6- β -LG com tratamento + SR 30s; 7 e 8- β -LG com tratamento +SR 60s + tripsina

Tal como se pode observar no poço 7 e 8 do gel da figura 3.2., conclui-se que ocorre digestão completa da proteína com a adição de tripsina e aplicação de ultra-sons durante 60 segundos.

O gel apresentado na figura 3.2 confirma os resultados anteriores e os géis realizados posteriormente permitiram concluir que sem o tratamento prévio da amostra da β -LG isolada e do leite, o tempo de hidrólise enzimática, mesmo combinado com ultra-sons, aumenta, não chegando esta a ser completa e não sendo visível na observação das bandas dos geis.

Testou-se também o método clássico de hidrólise enzimática “overnight”, mas tal como demonstrado em estudos anteriores [2], este método é muito moroso comparativamente aos métodos utilizados com os sonoreactores [2], ou seja, obteve-se tempos muito elevados de digestão não compensando a escolha deste método.

Uma vez para o leite não se obteve bons resultados sem o tratamento da amostra, testou-se outro tipo de equipamento de ultra-sons cujos resultados são apresentados de seguida.

3. 3. SondaUP50H

Seguem-se os resultados da análise por electroforese das amostras de leite (200 μ g) após digestão enzimática acelerada com sonda de ultra-sons com Sonda UP 50H e uma amplitude de 60% a uma Voltagem constante de 120V.

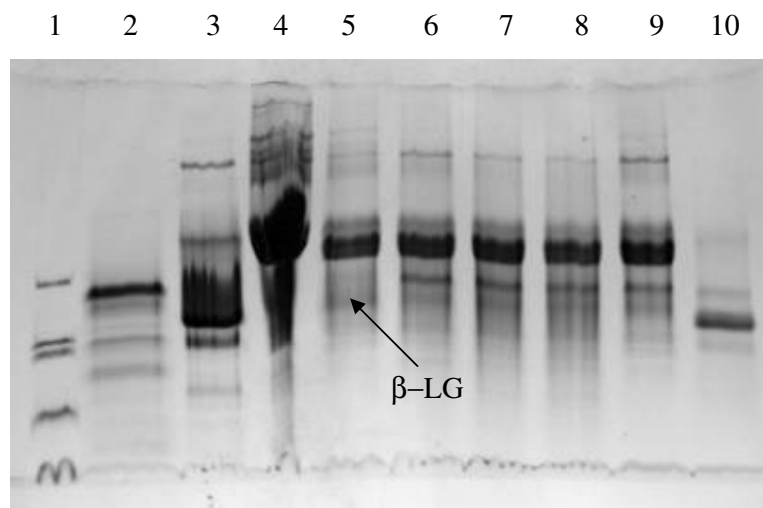


Figura 3.3 – Fotografia de gel poli-acrilamida SDS-PAGE Tris-Tricina 20%. Identificação dos poços: 1- Padrão; 2- Tripsina; 3- β -LG; 4- Leite; 5- leite +Sonda 6m; 6- leite +Sonda 2m + tripsina; 7- leite +Sonda 4m + tripsina; 8- leite +Sonda 6m + tripsina; 9- leite + tripsina 6m; 10- β -LG +Sonda 6m + tripsina

Após análise ao gel apresentado na figura 3.3, pode-se concluir que a concentração de leite usada foi muito elevada, uma vez que a banda obtida na electroforese (poço 4) ficou muito carregada. Tal concentração foi testada uma vez que em géis anteriores as bandas eram pouco intensas, mesmo com metodologias de resolução mais sensíveis como a coloração com Azul de *Coomassie*, Biosafe da Bio-rad e também com nitrato de prata. Sendo que não se verificaram diferenças significativas nos resultados.

Confirmam-se os resultados obtidos com o sonoreactor, mesmo com um aparelho de maior intensidade de sonicação, ou seja, mesmo com 6 minutos de aplicação de sonda não se consegue uma hidrólise completa da amostra de leite sem tratamento. O passo a seguir seria testar tempos superiores.

Utilizou-se um leite em pó magro, mas com elevado teor em cálcio, tal como se pode encontrar em praticamente todos os produtos comercializados.

O cálcio presente no leite e na amostra a tratar pode dificultar a hidrólise enzimática, uma vez que se tratava de um leite magro a concentração de cálcio era superior, mas no entanto a escolha deste leite justifica-se pelo facto de o teor em matéria gorda ser substancialmente mais reduzido, o que é importante para não ter interferências no tratamento da amostra e digestão enzimática. Também pelo facto de o leite comercial hidrolizado com tratamento térmico apresentar-se como leite magro, teríamos de ir de encontro com a oferta do mercado para aplicar esta metodologia.

No tratamento da proteína já se verificava alguma hidrólise química pela adição de Ureia, DTT, IAA e ácido fórmico. Esta adição poderia também inviabilizar o uso deste tratamento do leite à escala industrial para a produção de leite hidrolizado.

Também se utilizou um leite em pó de outra marca para poder comparar possíveis diferenças, não se obtendo variações nos resultados.

3. 4. Banhos ultra-sons Transsonic TI-H-5

Apresentam-se na tabela 3.6 os resultados da prova de degustação das amostras de leite tratadas com digestão enzimática acelerada com banho de ultra-sons e sem tratamento, tal como referido no ponto 2.5.4.

3.4.1 Resultados do teste de degustação

Tabela 3.6 – Resultados da prova de degustação do leite tratado com e sem tratamento

	Sabor		Cor		Odor		Provador	Idade	Género
	Amostra						experiente		
Provador	A	B	A	B	A	B			
1	1	3	2	4	2	2	n	27	f
2	1	3	2	4	2	2	n	57	f
3	1	0	2	4	2	2	n	24	m
4	1	1	2	4	1	2	n	35	f
5	1	0	2	2	2	1	n	26	f
6	1	3	2	1	1	2	n	25	m
7	3	3	2	3	2	2	n	25	f
8	3	2	2	3	2	2	n	26	f
9	0	0	2	3	2	2	n	26	f
10	4	3	2	3	2	2	n	38	f
11	0	1	2	4	2	2	n	34	f
12	1	1	2	1	2	2	n	39	m
13	3	3	2	4	2	2	n	28	f
14	1	3	2	4	1	2	n	24	m
15	3	1	2	4	1	2	n	40	m
16	1	3	1	2	2	2	n	25	f
17	1	0	2	4	1	1	n	33	f
18	1	3	2	4	1	1	s	33	m
19	1	3	1	4	2	1	n	25	f
	1	3	2	4	2	2	Pontuação mais frequente		

Tabela 3.7 – Escala de avaliação utilizada na prova de degustação.

Escala	Parâmetros		
	Sabor	Cor	Odor
0	neutro		
1	doce	branco	adocicado
2	ácido	esbranquiçado	neutro
3	amargo	amarelado	
4	salgado	incolor	

O teste de degustação teve como objectivo identificar o sabor, cor e odor das amostras apresentadas, comparando diferenças sensoriais entre as amostras apresentadas de leite com tratamento enzimático em banho de ultra-sons e sem tratamento.

A amostra A foi obtida directamente pela diluição do leite magro em pó, sem qualquer tipo de tratamento, enquanto que a amostra B foi obtida depois de tratamento térmico e hidrólise enzimática.

O tratamento térmico foi realizado com um aquecimento a 82°C durante 4 minutos.

O tratamento enzimático foi realizado com adição de tripsina e exposição da amostra em banho de ultras-sons a 37°C, amplitude de 100% durante 10 minutos, seguido de um tratamento térmico a 85°C durante 8 minutos para inactivação da tripsina.

Das duas amostras apresentadas, o provador foi convidado a degustar uma porção, cerca de 20ml de cada.

A amostra A, em termos de sabor, obteve uma avaliação que a caracterizou com uma amostra de sabor doce comparativamente com a amostra B que foi considerada como uma solução amarga.

Tal avaliação era esperada uma vez que a adição de tripsina e os péptidos obtidos pela hidrólise podem conferir um sabor amargo, tal como referido em estudos anteriores na revisão bibliográfica, onde podemos encontrar também alguns procedimentos que podem ser utilizados de forma a mascarar o sabor amargo desenvolvido nos hidrolizados enzimáticos (ponto 1.2.2.2).

Em relação à cor, a amostra A obteve uma avaliação que a caracterizou como esbranquiçada, enquanto que a amostra B foi considerada incolor.

A diluição na amostra A justifica o resultado obtido, e o tratamento térmico e enzimático na amostra B faz com que haja uma pequena diferença na intensidade da coloração.

No entanto espera-se que quando se passe para a escala industrial, no tratamento do leite na sua forma natural, a diferença de coloração seja imperceptível, uma vez que tratando-se do próprio produto, as concentrações sejam muito elevadas.

Quanto ao odor ambas as amostras apresentaram uma avaliação que as caracterizou com um odor neutro. Neste caso não seria de esperar diferenças entre amostras uma vez que o tratamento, pouca ou nenhuma influencia tem no odor do leite.

Em relação ao painel de provadores, podemos caracterizar como um painel sem experiência em provas de degustação, maioritariamente do sexo feminino e com um média de idade de 31 anos, sendo a idade mais baixa 24 anos e a idade mais elevada 40 anos.

O recrutamento do painel de provadores foi espontâneo e feito nas instalações da FCT, com professores, investigadores e alunos, onde se realizou a prova de degustação, com os requisitos mínimos exigidos para uma prova desta natureza.

Procedeu-se à distribuição e identificação das amostras de forma isolada, mantendo as amostras em gelo antes da degustação. Tentou-se ter a amostra à temperatura óptima antes da prova (4 a 10°C) [40].

3. 5. Resumo dos resultados

Pode-se comparar os ensaios realizados e os resultados obtidos com os diferentes equipamentos no resumo apresentado na tabela 3.8.

Tabela 3.8. – Resumo das condições de tratamento aplicado com digestão combinada com sonicação e resultados obtidos

Equipamento de sonicação	Potência (watts)	Frequência (kHz)	Tratamento prévio da amostra	Tempos de sonicação	Resultados
Tweeter	250	24	Sim	8 minutos : α -LA	Digestão parcial
Sonoreactor UTR200	200	24	Sim	60 segundos: β -LG	Digestão completa
Sonda UP50H	50	30	Não	6 minutos: leite	Digestão parcial

Em relação ao banho de ultra-sons, modelo Transsonic TI-H-5, foi utilizado apenas para tratar as amostras destinadas a degustação, que implicava volumes superiores aos utilizados nos ensaios.

4 - Conclusões

4. Conclusões

A utilização de ultrasons por um método não invasivo por exemplo com o aparelho de ultrasons Tweeter, revelou-se um sucesso parcial. Assim, o objectivo de conseguir uma digestão enzimática de proteínas completas com tempos inferiores a 5 minutos não foi atingido. No entanto, foi demonstrado que se consegue uma digestão parcial. Assim, aplicando a mesma tecnologia a aceleração da degradação enzimática do leite, foi comprovado que a degradação da mesma é, de facto, conseguida em tempos curtos.

Os estudos preliminares indicam que os tamanhos dos péptidos resultantes do leite tratado com enzimas e ultrasons apresentam tamanhos inferiores a 5 kDa, sendo a alergenicidade das proteínas, provavelmente, reduzida ou eliminada.

Em relação à digestão enzimática acelerada com o sonoreactor UTR200, obtiveram-se resultados muito diferentes, observados por electroforese. Por um lado a amostra da proteína β -LG com tratamento prévio de redução e alquilação, e por outro a amostra de leite sem tratamento prévio. No primeiro caso os tempos de hidrólise enzimática são mais curtos do que os tempos utilizados com o Tweeter, sendo a hidrólise completa, no segundo caso os tempos de hidrólise enzimática são mais longos, sendo a hidrólise incompleta.

No que diz respeito à digestão com a sonda UP50H não se obteve resultados significativamente diferentes dos obtidos com o sonoreactor UTR200

Em relação à aplicação de ultra-sons no leite para reduzir a presença das proteínas responsáveis pela alergenicidade pode-se concluir que é viável. É possível controlar a extensão do grau de hidrólise consoante o dispositivo de ultra-sons e com o mesmo aparelho é possível regular a amplitude dos ultra-sons de forma a obter diferentes graus de hidrólise.

Com esta aplicação dos ultra-sons e com diferentes graus de hidrólise pode-se obter dois tipos de produtos, por um lado um hidrolizado completo com alergenicidade nula e por outro um hidrolizado parcial com reduzida ou nula alergenicidade e a possibilidade de isolar e concentrar péptidos bioactivos com diversas aplicações funcionais desde a área de medicina à indústria alimentar.

A análise sensorial veio confirmar o que se esperava, ou seja, a digestão enzimática com a tripsina pode conferir ligeiras alterações no aspecto e sabor do leite. No entanto podem ser estudadas soluções para minimizar estas alterações.

5 – Perspectivas Futuras

5. Perspectivas Futuras

De modo a alcançar uma hidrólise acelerada mais eficaz poderiam estudar-se várias abordagens ao processo de tratamento do leite descrevendo-se as propostas seguintes:

Estudar as condições no tratamento da amostra, que poderá passar por prolongar tempos no pré-aquecimento e aumentar a temperatura de 82° para 90°C com e sem aplicação de ultras-sons.

Controlar o valor de pH da amostra antes e depois da adição da tripsina para que esta possa trabalhar em condições óptimas.

Rever a proporção proteína: tripsina, uma vez que em estudos anteriores concluiu-se que para a α -LA esta seria a proporção ideal [2], mas para o leite essa proporção poderá variar, tal como varia quando se trabalha com proteases diferentes [20].

Realizar ensaios de digestão enzimática com a tripsina imobilizada num suporte como esferas de alginato de cálcio ou outro tipo de matriz que no final do tratamento fosse facilmente recuperada.

Em relação à hidrólise branda pode ser explorada de modo conseguir reduzir ou eliminar a alergenicidade e preservar intactos os péptidos bioactivos, uma vez que estes podem apresentar propriedades funcionais a ser exploradas na área da medicina e na indústria alimentar.

Em relação à aplicação ultra-sónica na hidrólise enzimática do leite seria interessante verificar também em MALDI-TOF, os resultados de alguns estudos [65] que apresentam a identificação da posição de alguns péptidos bioactivos da β -LG.

Estudar meios para minimizar as alterações sensoriais provocadas pela hidrólise enzimática para além dos já existentes e referidos na revisão bibliográfica.

Determinar o valor nutricional em relação a possíveis alterações de ácidos gordos polinsaturados e perdas de vitaminas, em particular das vitaminas hidrossolúveis presentes no soro do leite: B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B6 (pirodoxina), B8 (biotina), B12 (cobalamina). Em relação à vitamina C não se justifica tal análise, visto esta encontrar-se em pequenas quantidades no leite [13].

6 – Referências Bibliográficas

6. Bibliografia

- [1] Torres D (2005) *Gelificação Térmica de Hidrolizados enzimáticos de Proteínas do Soro de Leite Bovino*. Universidade do Minho. Braga
- [2] Hugo MS (2007) *Efeito da energia de ultrasons na digestão enzimática rápida de proteínas para identificação por MALDI-TOF-MS*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
- [3] Capelo JL, Santos HM, (2007) Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment, *Talanta* **73** 795-802
- [4] Rial-Otero R, Carreira RJ, Cordeiro FM, Moro AJ, Fernandes L, Moura I, Capelo JL (2007) Sonoreactor-Based Technology for Fast High-Throughput Proteolytic Digestion of Proteins, *Journal of Proteome Research* **6** (2) 909-12
- [5] Balança Alimentar Portuguesa: 1980-92. INE (1994)
- [6] Balança Alimentar Portuguesa: 1990-97. INE (1999)
- [7] Faculdade de Ciências da Nutrição da Universidade do Porto, em URL: http://sigarra.up.pt/fcnaup/noticias_geral.ver_noticia?P_nr=10
- [8] NP 572. Leite. Definição e classificação. (1981)
- [9] Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ. (1993) *Powdered milk. Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. London: Academic Press **6** 3700-13.
- [10] Bizzotto CS, (2005) *Obtenção de Hidrolizados Proteicos de Arroz com Baixo Teor de Fenilalanina: Emprego da Pancreatina e da Corolase PP*. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, MG
- [11] Unilever, em URL: <https://www.unilever-jm.com/As-nossas-marcas/Alimentacao/becel.asp>
- [12] Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, Almeida IT, Rivera I, (2006) Fenilcetonúria Revisitada. *ArquiMed* **20** (5-6) 161-72
- [13] Tabela da Composição dos Alimento, Instituto Nacional de Saúde (2006)
- [14] FENALAC, em URL: <http://fenalac.pt/#/nutricionistas-pediatras>
- [15] Kilara A, Panyam D, (2003) Peptides from milk proteins and their properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **43** 6
- [16] Schlimme E, Meisel H. (1995) Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung* **39** (1) 1-20
- [17] Saito T. (2008) Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins *Adv Exp Med Biol.* **606** 295-317
- [18] Ferreira I, Pinho O (2006) Lacticínios que regulam a tensão arterial. *Anil*, **2** (8) 2-3

- [19] Meisel H (2004) Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors* **21** (1-4) 55-61
- [20] Biasutti EAR (2006) *Optimização das Condições da Hidrólise Enzimática das Proteínas do Soro de Leite para obter elevado teor de Oligopeptídeos*. Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG
- [21] P.J.A. Sheehy and P.A. Morrissey (1998) *Functional Foods: Prospects and Perspectives*. Department of Nutrition, University College, Cork, Ireland.
- [22] Rodrigues LRM (2001) *Valorização da Fracção Proteica do Soro de Queijo*. Escola de Engenharia da Universidade do Minho
- [23] Boza JJ, Martínez-Augustin O, Baró L, Suarez MD, Gil A (1995) Protein v. enzymic protein hydrolysates. Nitrogen utilization in starved rats. *British Journal of Nutrition* **73** 65-71
- [24] Ziemiański S, Cieślakowa D, Kunachowicz H, Palaszewska M (1978) Balanced intrainestinal nutrition: digestion, absorption and biological value of selected preparations of milk proteins. *Acta Physiol Pol.* **29** 543-556
- [25] Boza JJ, Moënnos D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Ballèvre O (2000) Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *European Journal of Nutrition* **39** 237-243
- [26] Protein Data Bank, em URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId>
- [27] UniProtKB/Swiss-Prot
- [28] Pintado ME, Maloata FX (2007) Alguns Contributos Biotecnológicos recentes para a valorização do principal subproduto da Indústria de Lacticínios, *Anilact* **1** (4) 2-5
- [29] Vieira C (2007) *Extração, Hidrólise e Remoção de Fenilalanina das proteínas de farinha de arroz*. Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte
- [30] Furtado MAM, Gomes JC, Silva CA, Ornellas CBD, Silvestre MPC (2001) Propriedades Funcionais de Hidrolizados de Proteína Láctea Co-precipitada. *Cienc agrotec., Lavras.* **25** 625-639
- [31] Santos HM, Rial-Otero R, Fernandes L, Vale G, Rivas MG, Moura I, Capelo JL (2007) Improving Sample Treatment for in-solution Protein Identification by Peptide Mass Fingerprint Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Journal of Proteome Research* **6** (9) 3393-9
- [32] Hielscher, em URL: <http://www.hielscher.com>
- [33] Elma, em URL: www.elma-ultrasonic.com
- [34] Breves do boletim informativo: Proteínas que causam alergia podem ser reduzidas por fermentação, *Anilact* (2007)

- [35] Luz Sanz M, Corzo-Martínez M, Rastall RA, Olano A, Moreno FJ (2007) Characterization and in vitro digestibility of bovine beta-lactoglobulin glycosylated with galactooligosaccharides. *Agric Food Chem* **55** (19) 7916-25
- [36] Zeece M, Huppertz T, Kelly A (2008) Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of β -LG. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9** (1) 62-69
- [37] Ashokkumar M, Sunartio D, Kentish S, Mawson R, Simons L, Vilku K, Versteeg C (2008) Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **9** (2) 155-160
- [38] Peñas E, Restani P, Ballabio C, Préstamo G, Fiocchi A, Gomez R. (2006) Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. *J Food Prot.* **69** 1707-12
- [39] Izquierdo F, Alli I, Gómez R, Ramaswamy H (2005) Effects of high pressure and microwave on pronase and alfa chymotrypsin hydrolysis of beta-lactoglobulina. *Food Chemistry* **92** (4) 713-719
- [40] Noronha JF (2003) Análise Sensorial – Metodologia. Escola Superior Agrária de Coimbra
- [41] Swaisgood HE (1989) *Structural changes in milk proteins*. In: Barth CA, Schlimme E, eds. *Milk proteins*. New York: Steinkopff Verlag Darmstadt 192-210.
- [42] Ramet JP. (1983) *Technological modification of milk lipids: effects of processing on milk flavor*. Delmont J, ed. New York
- [43] Campbell AM, Penfield MP, Griswold RM (1987) *Milk and milk products. The experimental study of food*. London
- [44] Centro de Nutrição e Alimentação Mimosa, em URL: www.cnamimosa.com.pt/artigos_prof_01.asp?tipo=3&categoria=3&artigo=9
- [45] NP 905. Leite concentrado. Leite condensado e leite evaporado. Definição, classificação, características e acondicionamento (1979)
- [46] Fellows P. (1990) *Dehydration. Food processing technology. Principles and practice*. New York: Ellis Horwood 281-313.
- [47] Holland B, Welch AA, Unwin ID, Buss DH, Paul AA, Southgate DAT (1991) *The Composition of Foods*. McCance and Widdowson's
- [48] Poças MF (2003) *Embalagem de Produtos Alimentares*, Escola Superior Biotecnologia da Universidade Católica do Porto

- [49] Dhar J, Davidson AGF, Martinez FE, Barr S, Desai ID, Nakai S (1995) Ultrasonication, Lyophilization, Freezing and Storage Effects on Fat Loss during Mechanical Infusion of Expressed Human Milk. *Journal of Food Science* **60** (2) 375–377
- [50] Panreac, *Leche y productos lácteos* (1999)
- [51] INETI, em: www.ineti.pt/produtos_e_servicos/main_prod_e_serv.aspx?mode=4&tipo=795&stipo=5930&UO=&subUO=
- [52] Veloso ACA, et al. (2001) Metodologias de Doseamento das Proteínas do Leite, *Boletim de Tecnologia* **69** 17-31
- [53] Canãs B, Piñeiro C, Calvo E, López-Ferrer D, Gallardo JM (2007) Trends in sample preparation for classic and second generation proteomics, *Journal of Chromatography A* **1153** 235-258
- [54] Rua JMF, (2002) La proteómica funcional abre vias de investigación sobre el Alzheimer, *ABC*
- [55] Isaac HJ. (2001) *Electroforesis*, **22**
- [56] G. Almeida, C. Rodrigues, J. Lampreia (2001) Proteómica: a Interface entre a Biologia Molecular e a Bioquímica de Proteínas, *Bol. Soc. Port. Química* **82** 49-56
- [57] Ricart CAO (1998) *Electroforesis Bidimensional como Ferramenta Proteômica*. Centro Brasileiro de Pesquisa de Proteínas. Departamento de Biologia celular da Universidade de Brasília
- [58] Miller I, Crawford J, Gianazza E (2006) Proteins stains for proteomic applications: Which, when, why? *Proteomics* **6** 5385-5408
- [59] Thiede B, Höhenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, Jungblut PR (2005) Peptide mass fingerprinting. *Methods* **35** 237-247
- [60] Hjerno K, Hojrup P, *Protein Identification by MALDI-TOF MS and database searching*. University of Southern Denmark
- [61] *Mundo Lácteo y Cárnico* Novembro/Dezembro (2005) 14-15
- [62] <http://www.gastropediatria.med.br>
- [63] Protocolo de Identificação de Proteínas por MALDI-TOF-MS, Curso Monográfico de MALDI-TOF-MS, DQ-FCT-UNL (2007)
- [64] Biocompare, em URL: <http://www.biocompare.com>
- [65] Groleau PE, Morin P, Gauthier SF, Pouliot Y (2003) Effect of physicochemical conditions on peptide-peptide interactions in a tryptic hydrolysate of beta-lactoglobulin and identification of aggregating peptides. *J Agric Food Chem* **16** 4370-5

7- ANEXOS

7. Anexos

Teste de degustação: Prova Discriminativa de Leites

Provador nº

Nome: _____ Data: _____

Idade: _____

Já participou anteriormente em provas sensoriais? Sim ____ Não ____

Objectivo: Identificar o sabor, cor e odor das amostras apresentadas, comparando diferenças sensoriais entre as amostras apresentadas de leite com tratamento enzimático em banho de ultra-sons e sem tratamento.

Das duas amostras apresentadas, prove uma porção (20ml) de cada, identificando de seguida o sabor e cor de cada uma das amostras.

Avance para a amostra seguinte, só depois de identificar devidamente a amostra degustada.

Em relação ao sabor utilize a expressão de entre as seguintes que mais se adequa à amostra, atribuindo o respectivo valor:

1- doce; 2- ácido; 3- amargo; 4 – salgado

Em relação à cor indique a cor ou tonalidade que mais se adequa à amostra:

1- Branco; 2- Esbranquiçado; 3- Amarelado; 4- Incolor

Em relação ao odor indique a que mais se adequa à amostra :

1- Adocicado; 2- Neutro

Amostra:	Sabor	Cor	Odor
A			
B			

Atenção:

Leve o tempo necessário na apreciação de cada amostra.

Aguarde alguns momentos entre cada prova, para que já não tenha dúvidas em relação à apreciação da amostra.

Obrigado pela colaboração